МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСУДАРСТВЕННАЯ
ФАРМАКОПЕЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

XIV издание

Том IV

Москва
2018

Аллерген туберкулезный рекомбинантный в стандартном разведении	ФС.3.3.1.0001.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на аллерген туберкулезный рекомбинантный в стандартном разведении, который представляет собой гибридный белок с молекулярной массой около 27 кДа, состоящий из 2 антигенов CFP10-ESAT6, продуцируемый генетически модифицированной культурой *Escherichia coli* BL21(DE3)/pCFP-ESAT.

Аллерген туберкулезный рекомбинантный предназначен для дифференциальной диагностики туберкулеза.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство препарата аллергена туберкулезного рекомбинантного должно осуществляться с соблюдением установленных правил организации производства и контроля качества биологических лекарственных средств, гарантирующих качество и безопасность для человека.

Выращенную культуру клеток бактерий-продуцентов отделяют от среды и лизируют для высвобождения белка. Лизат клеток-продуцентов проходит стадии хроматографического выделения и очистки целевого белка-концентрата. Очищенный концентрат – полуфабрикат (субстанция) аллергена туберкулезного подлежит проверке на стерильность, отсутствие сенсибилизирующих свойств, содержание белка, специфичность, специфическую активность, аномальную токсичность.

Стандартное разведение аллергена получают путем разведения концентрата изотоническим фосфатным буферным раствором до содержания 0,2 мкг гибридного белка в 0,1 мл.

Производственные штаммы: Рекомбинантный штамм *E.coli* BL21(DE3)/pCFP-ESAT– прототрофный штамм *E. coli* (депонирован в ИБХ РАН), который обладает рядом характеристик, отличающих его от штамма предшественника: быстрый рост на минимальной среде, способность к синхронизации, устойчивый рост культуры в условиях биосинтеза белка и недостатка питательных веществ, дефектность системы рестрикции ДНК В-типа. Штамм несет оригинальную плазмиду pCFP10-ESAT6, содержащую генетическую конструкцию из 2 генов *Mycobacterium tuberculosis – cfp10* и *esat 6* и ген устойчивости к ампициллину (*bla*). Штамм устойчив к ампициллину (100 – 150 мкг/мл) и чувствителен к остальным антибиотикам.

Для контроля качества препарата используют тест-штаммы *M.tuberculosis* (вирулентный) и *Mycobacterium bovis* BCG - 1 из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Бесцветная прозрачная жидкость без посторонних примесей.

Подлинность. Препарат при внутрикожном введении морским свинкам, зараженным тест-штаммом *M. tuberculosis*, должен вызывать положительные кожные реакции, а у животных, иммунизированных вакциной БЦЖ, реакции должны отсутствовать (разделы «Специфическая активность», «Специфичность»).

Прозрачность. Должен быть прозрачным. Определение проводят визуально в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

pH. От 7,35 до 7,55. Определяют потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Аномальная токсичность. Должен быть нетоксичным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность» на 5 мышах, тест-доза 0,5 мл.

Бактериальные эндотоксины. Не более 5 ЕЭ/мл. Определение проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

Стерильность. Должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методом прямого посева или мембранной фильтрации.

Специфическая активность. В 0,1 мл препарата должно содержаться 0,2 мкг аллергена туберкулезного рекомбинантного. Индекс специфической активности должен быть равен (1,00 ± 0,05). Испытание проводят на морских свинках, зараженных живой культурой *M. tuberculosis*.

Морских свинок (альбиносов или белокожих Hartley) массой (350±50) г содержат на постоянном пищевом рационе и в одинаковых условиях окружающей среды. Сенсибилизацию проводят путем заражения животных подкожно или аэрогенно вирулентным штаммом *M. tuberculosis*. Используют третью генерацию тест-штамма с плотной среды для выращивания микобактерий. Морских свинок используют для постановки проб не более 2 раз в период от 30 до 120 сут. после инфицирования с интервалом между постановками проб не менее 30 сут. При повторном использовании животных пробы ставят на участках кожи, ранее не подвергавшихся воздействию препаратов.

За 24 ч до постановки туберкулиновых проб шерсть на спине или боках морских свинок удаляют сплошной полосой шириной 3–4 см.

Испытание препарата проводят на 6 зараженных микобактериями туберкулеза морских свинках. Заполняют 4 шприца испытуемым образцом и 4

шприца разведенным (0,2 мкг/0,1 мл) стандартным образцом (СО) аллергена туберкулезного рекомбинантного. Каждой морской свинке по методу случайных чисел вводят по 0,1 мл внутрикожно 4 пробы испытуемого образца и 4 пробы СО. Реакцию учитывают через 24 ч, измеряя 2 взаимно перпендикулярных диаметра эритемы в мм. Подсчитывают суммы реакций на испытуемый препарат и на СО. Специфическую активность оценивают по индексу специфической активности (I) – отношению суммы реакций на испытуемый препарат к сумме реакций на разведенный СО при отсутствии достоверных различий между средними реакциями на испытуемый препарат и СО. Если полученные результаты выходят за указанные пределы, испытание повторяют. Результаты 2 испытаний усредняют.

Специфичность. Морские свинки, иммунизированные вакциной БЦЖ, не должны реагировать на внутрикожное введение 0,2 мкг в 0,1 мл испытуемого аллергена туберкулезного рекомбинантного и давать положительные реакции – папулы диаметром не менее 5 мм на 2 ТЕ в 0,1 мл СО очищенного туберкулина. Испытание проводят на 3 морских свинках не ранее чем через 30 дней после введения им по 0,5 мг вакцины БЦЖ.

Фенол. От 0,20 до 0,30 мг/мл. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение фенола спектрофотометрическим методом в биологических лекарственных препаратах».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственны средств» и ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортировка и хранение. При температуре от 2 до 8 ^{o}C в условиях, исключающих замораживание. Допускается транспортирование при температуре не выше 18 °С в течение 15 дней.

Анатоксин дифтерийно-столбнячный адсорбированный (АДС-анатоксин) ФС.3.3.1.0002.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на анатоксин дифтерийно-столбнячный адсорбированный (АДС-анатоксин), который представляет собой дифтерийный и столбнячный анатоксины, полученные из соответствующих экзотоксинов путем обезвреживания формальдегидом при нагревании, адсорбированные на алюминия гидроксиде или другом минеральном сорбенте, разрешенном к применению.

АДС-анатоксин предназначен для специфической профилактики дифтерии и столбняка.

ПРОИЗВОДСТВО

Все этапы производства АДС-анатоксина должны быть валидированы с целью подтверждения установленных требований и должны гарантировать безопасность его применения.

Столбнячный анатоксин

При производстве столбнячного анатоксина используют штаммы/штамм *Clostridium tetani*, полученные и депонированные в Государственной коллекции. Микробные клетки культивируют на жидких питательных средах, обеспечивающих высокую продукцию столбнячного токсина. Методы культивирования должны гарантировать сохранение свойств штаммов и предотвращать их контаминацию. Токсинсодержащую культуральную жид-

кость, освобожденную от микробных клеток и продуктов их распада, проверяют на стерильность, pH и содержание токсина.

Для производства столбнячного анатоксина используют культуральную среду с активностью токсина не менее 15 $L+/_{100}$ в 1 мл. Детоксикация столбнячного токсина должна обеспечивать сохранение антигенной активности анатоксина и гарантировать его безопасность: отсутствие остаточной токсичности (специфическая безопасность) и реверсии токсических свойств.

Для характеристики очищенного столбнячного анатоксина определяют его pH, специфическую (антигенную) активность, содержание общего и белкового азота, антигенную чистоту (удельную активность).

Столбнячный анатоксин должен быть очищен от примесей, вызывающих побочные реакции при введении человеку.

Для производства АДС-анатоксина используют только стерильный и безопасный столбнячный анатоксин с антигенной чистотой не менее 1000 ЕС (или Lf) на мг белкового азота.

Дифтерийный анатоксин

При производстве дифтерийного анатоксина используют токсигенный штамм *Corynebacterium diphtheriae*, полученный и депонированный в Государственной коллекции. Микробные клетки культивируют на жидких питательных средах, обеспечивающих высокую продукцию дифтерийного токсина. Методы культивирования должны гарантировать сохранение свойств штамма и предотвращать его контаминацию. Токсинсодержащую культуральную жидкость, освобожденную от микробных клеток и продуктов их распада, проверяют на стерильность, pH и содержание токсина.

Для производства дифтерийного анатоксина используют культуральную среду с активностью токсина не менее 80 Lf в 1 мл. Детоксикация дифтерийного токсина должна обеспечивать сохранение антигенной активности анатоксина и гарантировать его безопасность: отсутствие остаточной токсичности (специфическая безопасность) и реверсии токсических свойств.

Для характеристики очищенного дифтерийного анатоксина определяют его pH, специфическую (антигенную) активность, содержание общего и белкового азота, антигенную чистоту (удельную активность). Дифтерийный анатоксин должен быть очищен от примесей, вызывающих побочные реакции при введении человеку.

Для производства АДС-анатоксина используют только стерильный и безопасный дифтерийный анатоксин, содержащий не менее 1500 Lf на мг белкового азота.

Производственные штаммы должны быть депонированы в официальной коллекции и содержать следующую информацию: наименование штаммов; допустимое количество пассажей (при необходимости) и методику их проведения с указанием условий культивирования; при необходимости – дополнительные к паспортным данным требования к характеристикам штаммов.

Показатели, которые влияют на качество, но не могут быть определены в конечном продукте, должны быть проверены на промежуточных стадиях производства, что должно быть отражено в нормативной документации.

Прививочная доза (0,5 мл) содержит 30 Lf дифтерийного и 10 Lf/EC столбнячного анатоксинов. В состав лекарственного средства может входить консервант.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Опалесцирующая жидкость белого цвета, которая может иметь сероватый или желтоватый оттенок. При отстаивании она разделяется на рыхлый осадок белого или белого с сероватым или желтоватым оттенком цвета, легко диспергируемый при встряхивании, и прозрачную бесцветную надосадочную жидкость. Определяют визуально. Наблюдение проводят в проходящем свете.

Подлинность. Должен обладать специфической (иммуногенной) активностью, обеспечивая защиту от действия дифтерийного и столбнячного токсинов. Определение проводят в соответствии с разделом «Специфическая активность». Могут быть использованы другие валидированные методы, подтверждающие наличие в лекарственном препарате дифтерийного и столбнячного анатоксинов, обладающих антигенной активностью.

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH. От 6,4 до 7,3, если нет других указаний в нормативной документации. Испытания проводят потенциометрическим методом с неразведенным АДС-анатоксином в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Проходимость через иглу. Гомогенная взвесь, диспергированная путем встряхивания, должна свободно проходить в шприц через иглу 08·40, если нет других указаний в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Суспензии».

Время седиментационной устойчивости. После встряхивания и получения гомогенной взвеси не должно наблюдаться полного расслаивания в течение не менее 1 мин, если нет других указаний в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Инъекционные лекарственные формы. Лекарственные средства для парентерального применения».

Стерильность. Должен быть стерильным. Испытания проводят методами прямого посева или мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность». Для контроля используют тиогликолевую среду. Посевы инкубируют при температуре 20 – 25 ºС и 30 – 35 ºС.

Аномальная токсичность. Должен быть нетоксичным. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Белым мышам

массой 16 – 18 г препарат вводят внутрибрюшинно по 1 мл, морским свинкам – подкожно по 5 мл (по 2,5 мл в оба бока). За животными наблюдают 7 сут.

В течение указанного времени не должны наблюдаться гибель животных и потеря массы тела.

Специфическая безопасность. Должен быть безопасным при подкожном введении 5 морским свинкам массой 250–350 г 10 прививочных доз для человека (по 5 доз в бок и лапку). Через 30 дней все животные должны остаться живыми без симптомов столбняка и потери массы тела. Если животное погибло от дифтерийной интоксикации (алая окраска и увеличение надпочечников при аутопсии погибших животных), препарат признается непригодным к применению. Если гибель животного или потеря массы тела произошла по причине, не связанной со специфической интоксикацией, испытание повторяют. Если при повторном испытании наблюдается гибель животных, лекарственный препарат не соответствует требованиям.

Специфическая (иммуногенная) активность. Специфическая активность прививочной дозы (0,5 мл) должна быть не ниже 30 МЕ для дифтерийного компонента и не ниже 40 МЕ для столбнячного компонента. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Иммуногенность адсорбированного дифтерийного анатоксина» и ОФС «Иммуногенность адсорбированного столбнячного анатоксина».

Полнота сорбции. В 1 мл надосадочной жидкости содержание неадсорбированного дифтерийного анатоксина не должно превышать 1 Lf, неадсорбированного столбнячного анатоксина – 0,1 ЕС, если нет других указаний в нормативной документации.

Определение содержания неадсорбированного дифтерийного анатоксина в надосадочной жидкости проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания анатоксинов/токсинов в реакции флокуляции», неадсорбированного столбнячного анатоксина – в соответствии с ОФС «Определение со-

держания анатоксинов/токсинов в реакции антитоксинсвязывания», если нет других указаний в нормативной документации.

Формальдегид. Не более 100 мкг/мл. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение формальдегида в биологических лекарственных препаратах».

Консерванты. Тиомерсал. Концентрация консерванта не должна быть ниже минимально эффективной и не должна превышать указанную на упаковке более чем на 15 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение тиомерсала в биологических лекарственных препаратах». Не рекомендуется использование консерванта при производстве лекарственных препаратов, выпускаемых в однодозовой расфасовке.

Сорбенты. Алюминия гидроксид. Не более 1,1 мг/мл алюминия(III), если в нормативной документации нет иных указаний. Определение проводят комплексонометрическим методом в соответствии с ОФС «Определение ионов алюминия в сорбированных биологических лекарственных препаратах».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственны средств» и ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С.

Анатоксин дифтерийно-столбнячный адсорбированный с уменьшенным содержанием антигенов (АДС-М-анатоксин)	ФС.3.3.1.0003.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на анатоксин дифтерийно-столбнячный адсорбированный с уменьшенным содержанием антигенов (АДС-М-анатоксин), который представляет собой дифтерийный и столбнячный анатоксины, полученные из соответствующих экзотоксинов путем обезвреживания формальдегидом при нагревании; анатоксины очищены и адсорбированы на алюминия гидроксиде или другом разрешенном к применению минеральном сорбенте.

АДС-М-анатоксин предназначен для специфической профилактики дифтерии и столбняка.

ПРОИЗВОДСТВО

Все этапы производства АДС-М-анатоксина должны быть валидированы с целью подтверждения установленных требований и должны гарантировать безопасность его применения.

Столбнячный анатоксин

При производстве столбнячного анатоксина используют штаммы/штамм *Clostridium tetani*, полученные и депонированные в Государственной коллекции. Микробные клетки культивируют на жидких питательных средах, обеспечивающих высокую продукцию столбнячного токсина. Методы культивирования должны гарантировать сохранение свойств штаммов и предотвращать их контаминацию. Токсинсодержащую культуральную жид-

кость, освобожденную от микробных клеток и продуктов их распада, проверяют на стерильность, pH и содержание токсина.

Для производства столбнячного анатоксина используют культуральную среду с активностью токсина не менее 15 $L+/_{100}$ в 1 мл. Детоксикация столбнячного токсина должна обеспечивать сохранение антигенной активности анатоксина и гарантировать его безопасность: отсутствие остаточной токсичности (специфическая безопасность) и реверсии токсических свойств.

Для характеристики очищенного столбнячного анатоксина определяют его pH, специфическую (антигенную) активность, содержание общего и белкового азота, антигенную чистоту (удельную активность).

Столбнячный анатоксин должен быть очищен от примесей, вызывающих побочные реакции при введении человеку.

Для производства АДС-М-анатоксина используют только стерильный и безопасный столбнячный анатоксин с антигенной чистотой не менее 1000 ЕС (или Lf) на мг белкового азота.

Дифтерийный анатоксин

При производстве дифтерийного анатоксина используют токсигенный штамм *Corynebacterium diphtheriae*, полученный и депонированный в Государственной коллекции. Микробные клетки культивируют на жидких питательных средах, обеспечивающих высокую продукцию дифтерийного токсина. Методы культивирования должны гарантировать сохранение свойств штамма и предотвращать его контаминацию. Токсинсодержащую культуральную жидкость, освобожденную от микробных клеток и продуктов их распада, проверяют на стерильность, pH и содержание токсина. Для производства дифтерийного анатоксина используют культуральную среду с активностью токсина не менее 80 Lf в 1 мл. Детоксикация дифтерийного токсина должна обеспечивать сохранение антигенной активности анатоксина и гарантировать его безопасность: отсутствие остаточной токсичности (специфическая безопасность) и реверсии токсических свойств.

Для характеристики очищенного дифтерийного анатоксина определяют его pH, специфическую (антигенную) активность, содержание общего и белкового азота, антигенную чистоту (удельную активность). Дифтерийный анатоксин должен быть очищен от примесей, вызывающих побочные реакции при введении человеку.

Для производства АДС-М-анатоксина используют только стерильный и безопасный дифтерийный анатоксин, содержащий не менее 1500 Lf на мг белкового азота.

Прививочная доза АДС-М-анатоксина (0,5 мл) содержит 5 Lf дифтерийного и 5 Lf/ЕС столбнячного анатоксинов. В состав лекарственного средства может входить консервант.

Производственные штаммы. Должны содержать следующую информацию: наименование штаммов; место их депонирования; допустимое количество пассажей (при необходимости) и методику их проведения с указанием условий культивирования; при необходимости – дополнительные к паспортным данным требования к характеристикам штаммов.

Показатели, которые влияют на качество, но не могут быть определены в конечном продукте, должны быть проверены на промежуточных стадиях производства, что должно быть отражено в нормативной документации.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Опалесцирующая жидкость белого цвета, которая может иметь сероватый или желтоватый оттенок. При отстаивании разделяется на рыхлый осадок белого или белого с сероватым или желтоватым оттенком цвета, легко диспергирующийся при встряхивании, и прозрачную бесцветную надосадочную жидкость. Испытания проводят визуально в проходящем свете.

Подлинность. Должен обладать специфической (иммуногенной) активностью, обеспечивая защиту от действия дифтерийного и столбнячного

токсинов (раздел «Специфическая активность»). Могут быть использованы другие валидированные методы, подтверждающие наличие в лекарственном средстве дифтерийного и столбнячного анатоксинов, обладающих антигенной активностью.

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH. От 6,4 до 7,3. Испытания проводят потенциометрическим методом с неразведенным АДС-М-анатоксином в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Проходимость через иглу. Гомогенная взвесь, диспергированная путем встряхивания, должна свободно проходить в шприц через иглу 0,8·40. Определение проводят в соответствии с ОФС «Суспензии».

Время седиментационной устойчивости. После встряхивания и получения гомогенной взвеси не должно наблюдаться полного расслаивания в течение не менее 1 мин, если нет других указаний в нормативной документации производителя. Определение проводят в соответствии с ОФС «Инъекционные лекарственные формы. Лекарственные средства для парентерального применения».

Стерильность. Должен быть стерильным. Испытания проводят методами прямого посева или мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность». Для посева используют тиогликолевую среду. Посевы инкубируют при температуре 30–35 и 20–25 ºС.

Аномальная токсичность. Должен быть нетоксичным. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Белым мышам массой 16 – 18 г препарат вводят внутрибрюшинно по 1 мл, морским свинкам – подкожно по 5 мл (по 2,5 мл в оба бока). За животными наблюдают 7 сут. В течение указанного времени не должны наблюдаться гибель животных и потеря массы тела.

Специфическая безопасность. Должен быть безопасным при подкожном введении 5 морским свинкам массой 250 – 350 г 10 прививочных доз для человека (по 5 доз в бок и бедро). Через 30 дней все животные должны остаться живыми, без симптомов столбняка и потери массы тела. В случае гибели 1 животного или потери массы тела хотя бы 1 из животных от неспецифических причин испытание повторяют. Если при повторном испытании наблюдают гибель более 1 животного, препарат считают не соответствующим требованиям.

Специфическая (иммуногенная) активность. Должен обладать иммуногенной активностью, обеспечивая выживаемость 100 % иммунизированных животных при заражении летальной дозой дифтерийного токсина и не менее 70 % иммунизированных животных при заражении летальной дозой столбнячного токсина.

Материалы и животные:

– дифтерийный токсин с предварительно установленной величиной Dlm (минимальная доза токсина, вызывающая гибель животных в течение 4 сут);

– столбнячный токсин с предварительно установленной величиной Dlm;

– морские свинки массой 250 – 350 г;

– мыши белые беспородные массой 14–16 г.

Испытание иммуногенности дифтерийного компонента. Неразведенный препарат вводят 4 морским свинкам массой 250–350 г однократно под кожу бока в дозе 0,6 мл, что соответствует (6,0 ± 0,3) Lf дифтерийного анатоксина. Через 30 сут определяют резистентность иммунизированных свинок к дифтерийному токсину, который вводят животным в дозе не менее 100 Dlm подкожно в бок в объеме 1 мл. За животными наблюдают 4 сут, в течение которых все морские свинки должны остаться живыми. Испытание сопровождают контролем 1 Dlm дифтерийного токсина на 3 морских свинках из той

же партии. Контрольные животные (не менее 2) должны погибнуть в течение 4 сут.

Испытание иммуногенности столбнячного компонента. Препарат разводят стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида до 4 ЕС/мл и вводят группе из 10 белых мышей массой 16 – 18 г подкожно в область внутренней поверхности верхней трети бедра в дозе (2,0±0,1) ЕС в объеме 0,5 мл. Через 21 сут определяют резистентность иммунизированных мышей к столбнячному токсину, который вводят животным в дозе не менее 50 Dlm под кожу внутренней поверхности верхней трети бедра в объеме 0,5 мл. За животными наблюдают в течение 4 сут. Препарат считают выдержавшим испытание, если не менее 7 мышей останутся живыми без явлений столбняка. Опыт сопровождают контролем 1 Dlm столбнячного токсина на 4 мышах из той же партии. Контрольные животные (не менее 2) должны погибнуть в течение 4 сут.

Полнота сорбции. В 1 мл надосадочной жидкости содержание неадсорбированного дифтерийного анатоксина не должно превышать 1 Lf, неадсорбированного столбнячного анатоксина – 0,1 ЕС.

Полноту сорбции определяют путем индикации неадсорбированных дифтерийного и столбнячного анатоксинов в надосадочной жидкости АДС-М-анатоксина. Определение содержания неадсорбированного дифтерийного анатоксина в надосадочной жидкости проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания анатоксинов/токсинов в реакции флокуляции», неадсорбированного столбнячного анатоксина – в соответствии с ОФС «Определение содержания анатоксинов/токсинов в реакции антитоксинсвязывания», если нет других указаний в нормативной документации.

Формальдегид. Не более 100 мкг/мл. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение формальдегида в биологических лекарственных препаратах».

Консерванты. Тиомерсал. Концентрация консерванта не должна быть ниже минимально эффективной и не должна превышать указанную на упа-

ковке более чем на 15%. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение тиомерсала в биологических лекарственных препаратах». Не рекомендуется использование консервантов при производстве лекарственных препаратов, выпускаемых в однодозовой расфасовке.

Сорбенты. Алюминия гидроксид. Не более 1,1 мг/мл алюминия(III), если в нормативной документации нет иных указаний. Определение проводят комплексонометрическим методом в соответствии с ОФС «Определение ионов алюминия в сорбированных биологических лекарственных препаратах».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственны средств» и ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С.

Анатоксин дифтерийный адсорбированный с уменьшенным содержанием антигена (АД-М-анатоксин)	ФС.3.3.1.0004.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на анатоксин дифтерийный адсорбированный с уменьшенным содержанием антигена (АД-М-анатоксин), который представляет собой дифтерийный анатоксин, полученный из дифтерийного экзотоксина путем обезвреживания формальдегидом при нагревании, очищенный и адсорбированный на алюминия гидроксиде или другом разрешенном к применению минеральном сорбенте.

Препарат предназначен для специфической профилактики дифтерии.

ПРОИЗВОДСТВО

Все этапы производства АД-М-анатоксина должны быть валидированы с целью подтверждения установленных требований и должны гарантировать безопасность его применения.

Дифтерийный анатоксин представляет собой токсин *Corynebacterium diphtheriae*, обезвреженный и очищенный способом, гарантирующим полную стабильную детоксикацию при сохранении антигенной активности. Для получения дифтерийного токсина используют токсигенный штамм *C. diphtheriae*, полученный и депонированный в Государственной коллекции. Микробные клетки культивируют на жидких питательных средах, обеспечивающих высокую продукцию дифтерийного токсина. Методы культивирования должны гарантировать сохранение свойств штамма и предотвращать его контаминацию. Токсинсодержащую культуральную жидкость, освобожденную

от микробных клеток и продуктов их распада, проверяют на стерильность, pH и содержание токсина. Для производства дифтерийного анатоксина используют культуральную среду с активностью токсина не менее 80 Lf в 1 мл. Детоксикация дифтерийного токсина и очистка дифтерийного анатоксина (кислотно-солевое осаждение, мембранная фильтрация) должны обеспечивать сохранение антигенной активности анатоксина и гарантировать его безопасность: отсутствие остаточной токсичности (специфическая безопасность) и реверсии токсических свойств.

Для характеристики очищенного дифтерийного анатоксина определяют его pH, специфическую (антигенную) активность, содержание общего и белкового азота, антигенную чистоту (удельную активность). Дифтерийный анатоксин должен быть очищен от примесей, вызывающих побочные реакции при введении человеку.

Для производства АД-М-анатоксина можно использовать только стерильный и безопасный дифтерийный анатоксин с активностью не менее 1500 Lf на мг белкового азота.

Показатели, которые влияют на качество, но не могут быть определены в конечном продукте, должны быть проверены на промежуточных стадиях производства, что должно быть отражено в нормативной документации.

Прививочная доза (0,5 мл) содержит 5 Lf дифтерийного анатоксина. В состав лекарственного средства может входить антимикробный консервант.

Производственные штаммы. Должны содержать следующую информацию: наименование штаммов; место их депонирования; допустимое количество пассажей (при необходимости) и методику их проведения с указанием условий культивирования; при необходимости – дополнительные к паспортным данным требования к характеристикам штаммов.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Опалесцирующая жидкость белого цвета, которая может иметь сероватый или желтоватый оттенок. При отстаивании разделяется на рыхлый осадок белого или белого с сероватым или желтоватым оттенком

цвета, легко диспергирующийся при встряхивании, и прозрачную бесцветную надосадочную жидкость. Испытания проводят визуально в проходящем свете.

Подлинность. Должен обладать специфической (иммуногенной) активностью, обеспечивая защиту от действия дифтерийного токсина (раздел «Специфическая активность»). В нормативной документации могут быть указаны альтернативные методы, подтверждающие наличие в лекарственном средстве дифтерийного анатоксина, обладающего антигенной активностью.

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH. От 6,4 до 7,3, если нет других указаний в нормативной документации. Испытание проводят потенциометрическим методом с неразведенным АД-М-анатоксином в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Проходимость через иглу. Гомогенная взвесь, диспергированная путем встряхивания, должна свободно проходить в шприц через иглу 08·40, если нет других указаний в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Суспензии».

Время седиментационной устойчивости. После встряхивания и получения гомогенной взвеси не должно наблюдаться полного расслаивания в течение не менее 1 мин, если нет других указаний в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Инъекционные лекарственные формы. Лекарственные средства для парентерального применения».

Стерильность. Должен быть стерильным. Испытания проводят методами прямого посева или мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность». Для контроля используют тиогликолевую среду. Посевы инкубируют при температуре 20 – 25 ºС и 30 – 35 ºС.

Аномальная токсичность. Должен быть нетоксичным. Контроль проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Белым мышам препарат вводят внутрибрюшинно по 1 мл, морским свинкам – подкожно по 5 мл (по 2,5 мл в оба бока). За животными наблюдают 7 сут. В течение указанного времени не должно быть гибели животных и потери массы тела.

Специфическая безопасность. Должен быть безопасным при подкожном введении 5 морским свинкам массой 250 – 350 г 10 прививочных доз для человека (по 2,5 мл в оба бока). Через 30 дней все животные должны остаться живыми без потери массы тела. При гибели 1 из животных опытной группы производят его вскрытие и оценку состояния надпочечников (алая окраска надпочечников является признаком дифтерийной интоксикации). Если животное погибло от дифтерийной интоксикации, препарат непригоден к применению. Если гибель животного или потеря массы тела произошла по причине, не связанной со специфической интоксикацией, испытание повторяют. Если при повторном испытании наблюдается гибель животных, лекарственный препарат признают не соответствующим требованиям.

Специфическая (иммуногенная) активность. Должен обладать иммуногенной активностью. Показатель выживаемости иммунизированных животных должен быть не менее 100 % при заражении летальной дозой дифтерийного токсина.

Материалы и животные:

- испытуемый образец лекарственного средства;

- дифтерийный токсин с предварительно установленной величиной Dlm (минимальная доза токсина, вызывающая гибель животных в течение 4 сут);

- морские свинки массой 250 – 350 г.

Проведение испытания. Неразведенный АД-М-анатоксин вводят 4 морским свинкам массой 250 – 350 г однократно под кожу бока в дозе 0,6 мл. Через 30 сут определяют резистентность иммунизированных свинок к дифтерийному токсину, который вводят животным в дозе не менее 100 Dlm под-

кожно в бок в объеме 1 мл. За животными наблюдают 4 сут, в течение которых все морские свинки должны остаться живыми. Испытание сопровождают контролем 1 Dlm дифтерийного токсина на 3 морских свинках из той же партии. Контрольные животные (не менее 2 из 3) должны погибнуть в течение 4 сут.

Полнота сорбции. В 1 мл надосадочной жидкости содержание неадсорбированного дифтерийного анатоксина не должно превышать 1 Lf, если нет других указаний в нормативной документации.

Полноту сорбции определяют путем индикации неадсорбированного дифтерийного анатоксина в надосадочной жидкости препарата АД-М-анатоксин. Определение содержания неадсорбированного дифтерийного анатоксина в надосадочной жидкости проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания анатоксинов/токсинов в реакции флокуляции», если нет других указаний в нормативной документации.

Формальдегид. Не более 100 мкг/мл. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение формальдегида в биологических лекарственных препаратах».

Консерванты. Тиомерсал. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение тиомерсала в биологических лекарственных препаратах». Концентрация консерванта не должна быть ниже минимально эффективной и не должна превышать указанную на упаковке более чем на 15 %. Не рекомендуется использование консервантов при производстве лекарственных препаратов, выпускаемых в однодозовой расфасовке.

Сорбенты. Алюминия гидроксид. Не более 1,1 мг/мл алюминия (III), если в нормативной документации нет иных указаний. Определение проводят комплексонометрическим методом в соответствии с ОФС «Определение ионов алюминия в сорбированных биологических лекарственных препаратах».

Могут использоваться и другие адсорбенты, эффективность и безопасность которых при соответствующем пути введения установлена.

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственны средств» и ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С.

Анатоксин стафилококковый очищенный адсорбированный, суспензия для подкожного введения	ФС.3.3.1.0005.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на анатоксин стафилококковый очищенный адсорбированный, суспензию для подкожного введения, который представляет собой токсин стафилококковый, обезвреженный формалином при нагревании, очищенный от балластных белков способом, гарантирующим полную детоксикацию и отсутствие возможности реверсии токсичности при сохранении антигенной и иммуногенной активности, адсорбированный на алюминия гидроксиде или другом разрешенном к применению минеральном адсорбенте.

При подкожном введении анатоксин стафилококковый очищенный адсорбированный вызывает образование специфических антител (антитоксинов) к экзотоксину стафилококковому.

Область применения:

- профилактика стафилококковых инфекций у лиц с повышенным риском заболевания (промышленные и сельскохозяйственные рабочие, подвергающиеся по роду своей деятельности частому травматизму), а также у больных, которым предстоят плановые операции;

- иммунизация доноров с целью получения антистафилококковой плазмы и изготовления антистафилококкового иммуноглобулина.

ПРОИЗВОДСТВО

При производстве анатоксина стафилококкового очищенного используют штамм *Staphylococcus aureus* O15 (или другой штамм стафилококка, обладающий аналогичными свойствами), который депонирован в официальной коллекции, происхождение и история которого документированы.

При культивировании на жидких питательных средах штамм должен образовывать экзотоксин (синонимы: токсин стафилококковый, альфатоксин, альфастафилолизин). Метод культивирования должен обеспечивать высокую продукцию токсина, сохранять гемолитические свойства штамма и исключать контаминацию штамма посторонней микрофлорой. Токсинсодержащая культуральная жидкость, освобожденная от микробных клеток и продуктов их распада, должна содержать токсин стафилококковый с гемолитической активностью не менее 500 DHM (минимальная гемолитическая доза) и иметь Lh (лимит гемолитического действия) токсина не более 0,4 мл. Способ детоксикации токсина стафилококкового должен гарантировать отсутствие токсичности и возможность ее реверсии при сохранении антигенной (не менее 2 ЕС/мл) и иммуногенной (способность вызывать образование специфических антител) активности анатоксина стафилококкового. Последующая концентрация должна обеспечить содержание в 1 мл концентрата не менее 30 ЕС (единиц связывания).

Для производства анатоксина стафилококкового адсорбированного проводят сорбцию полученного концентрированного анатоксина, добавляя необходимое (расчётное) количество сорбента. Сорбция должна быть полной.

Производственный штамм**.** Должен содержать следующую информацию: наименование штамма(ов); место депонирования; морфологическую характеристику; при необходимости – допустимое количество пассажей и методику их проведения с указанием субстрата и условий культивирования; дополнительные к паспортным данным требования к характеристикам штаммов.

Для характеристики анатоксина стафилококкового очищенного адсорбированного, суспензии для подкожного введения, определяют: pH, время седиментационной устойчивости, проходимость через иглу, дисперсность, стерильность, аномальную токсичность, специфическую безвредность, специфическую активность, полноту сорбции, содержание формальдегида, сорбента и консерванта.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Суспензия белого цвета с желтоватым оттенком, разделяющаяся при стоянии на прозрачную надосадочную жидкость и рыхлый осадок, полностью диспергируемый при встряхивании. Определение проводят визуально.

Подлинность. Должен вызывать образование антител к токсину стафилококковому. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания антиальфастафилолизина (специфических антител) в препаратах крови человека и животных».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Нормативные требования указывают в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

pH. От 6,2 до 7,4 (если нет других указаний в нормативной документации). Определение проводят потенциометрически с неразведенным препаратом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Время седиментационной устойчивости. После встряхивания не должно наблюдаться расслаивания в течение 2,5 мин.

Проходимость через иглу. Гомогенная взвесь, диспергированная путем встряхивания, должна свободно проходить в шприц через иглу 0,8·40, если нет других указаний в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Суспензии».

Дисперсность. Показатель дисперсности от 0,6 до 1,4. Определение проводят фотометрически при разведении препарата 1:1 0,9 % раствором

натрия хлорида в соответствии с указаниями в нормативной документации.

Стерильность. Препарат должен быть стерильным. Определение проводят методом прямого посева в соответствии с ОФС «Стерильность».

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичным.

Белым мышам (5 животным) массой тела 18–20 г препарат вводят внутрибрюшинно по 0,5 мл, 2 морским свинкам массой 250–300 г – подкожно по 2 мл.

Препарат считают выдержавшим испытание, если:

- в течение 7 сут наблюдения все животные остались живы и ни у одного из животных не были выявлены видимые признаки заболевания;

- ни у одного из животных не отмечена потеря массы тела;

- ни у одной морской свинки в месте введения препарата не развился абсцесс или некроз.

Если в течение периода наблюдения регистрируют гибель хотя бы 1 животного, заболевание, уменьшение массы тела или повреждение в месте инъекции, испытание повторяют на удвоенном количестве животных при тех же условиях учета опыта. Повторное испытание считают удовлетворительным, если препарат отвечает вышеперечисленным требованиям.

Специфическая безвредность. Препарат должен быть безвредным.

Кролику массой 2 – 2,5 кг препарат вводят подкожно по 2,5 мл в оба бока. Препарат считают выдержавшим испытание, если в течение 5 сут наблюдения кролик остаётся здоровым, и в местах введения препарата отсутствуют явления некроза тканей.

Специфическая активность (иммуногенность). Препарат должен вызывать образование специфических антител при подкожном введении (содержание антиальфастафилолизина (специфических антител)) в сыворотках крови иммунизированных кроликов должно быть не менее 3 МЕ в 1 мл (среднеарифметическое значение).

Кроликам (3 животным) массой (2,0 ± 0,5) кг препарат вводят в объеме 0,5 мл подкожно двукратно с интервалом 17 – 20 сут. Через 8 – 10 сут после

последней иммунизации у кроликов берут кровь из краевой вены уха и определяют в сыворотке крови каждого иммунизированного животного содержание антиальфастафилолизина. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение антиальфастафилолизина (специфических антител) в лекарственных препаратах из сыворотки крови человека и животных».

Примечание

Для проведения испытаний по показателям «Специфическая безвредность» и «Специфическая активность (иммуногенность)» используют кроликов, у которых содержится не более 0,125 МЕ антиальфастафилолизина в 1 мл сыворотки крови. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания антиальфастафилолизина (специфических антител) в лекарственных препаратах из сыворотки крови человека и животных».

Полнота сорбции. Сорбция стафилококкового анатоксина должна быть полной. Надосадочная жидкость не должна содержать свободного стафилококкового анатоксина. Допускается наличие в 1 мл надосадочной жидкости не более 0,2 ЕС антиальфастафилолизина (1 ЕС представляет собой минимальное количество анатоксина, которое связывает 1 МЕ (Международная единица) антиальфастафилолизина).

Для постановки реакции используют следующие ингредиенты:

– испытуемый анатоксин стафилококковый;

– стандартный образец (СО) антиальфастафилолизина с установленным содержанием стафилококковых антител (МЕ/мл);

– токсин стафилококковый, гемолитические свойства которого характеризуются величиной Lh (лимит гемолитического действия – минимальное количество токсина стафилококкового, которое, будучи связано с 1 МЕ антиальфастафилолизина, вызывает почти полный (+++) гемолиз эритроцитов кролика);

– 15 % взвесь эритроцитов кролика;

– 0,9 % раствор натрия хлорида.

Для определения полноты сорбции в 4 пробирки (опытный ряд) наливают надосадочную жидкость испытуемого препарата: в первую пробирку –

1 мл неразведенной надосадочной жидкости, в остальные пробирки вносят по 1 мл надосадочной жидкости, разведенной 0,9% раствором натрия хлорида соответственно в 2, 5, 10 раз. В каждую пробирку добавляют по 1 мл раствора СО антиальфастафилолизина, разведенного до содержания 0,2 МЕ/мл. Пробирки осторожно встряхивают и выдерживают 20 мин при температуре 18 – 20 °С.

Проведение испытания сопровождается 4 контролями:

1. Первый контроль (пробирка № 1) – контроль «полноты» нейтрализации Lh токсина стафилококкового в условиях испытания. В пробирку вносят 1 мл СО антиальфастафилолизина, содержащего 0,2 МЕ/мл антиальфастафилолизина и прибавляют 1мл 0,9 % раствора натрия хлорида.

2. Второй контроль (пробирка № 2) – контроль отсутствия спонтанного лизиса эритроцитов кролика. В пробирку вносят 2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида.

3. Третий контроль (пробирка № 3) – контроль гемолитического действия токсина стафилококкового в условиях испытания. В пробирку вносят 2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида.

4. Четвертый контроль (пробирка № 4) – контроль отсутствия лизиса эритроцитов надосадочной жидкостью. В пробирку вносят 2 мл надосадочной жидкости испытуемого образца.

В пробирки опытного ряда и контрольные пробирки № 1 и № 3 добавляют токсин стафилококковый в дозе Lh/10. В контрольные пробирки № 2 и № 4 токсин не добавляют.

Все пробирки встряхивают и выдерживают 20 мин при температуре

(20 ± 2) °С. Далее в каждую пробирку добавляют по 2 капли (0,1 мл) 15 % взвеси эритроцитов, приготовленной в день испытания; пробирки вновь встряхивают и выдерживают в течение 1 ч при температуре (37 ± 1) °С, а затем – 1 ч при температуре (20 ± 2) °С.

Результаты испытания учитывают визуально по степени гемолиза эритроцитов:

«++++» – полный гемолиз эритроцитов;

«+++» – почти полный гемолиз эритроцитов;

«++» – частичный гемолиз (50 % гемолиз эритроцитов);

«+» – следы гемолиза эритроцитов;

«–» – отсутствие гемолиза эритроцитов.

Учет результатов испытания начинают с определения результатов контроля.

В первом, втором и четвертом контроле гемолиз эритроцитов должен отсутствовать. Отсутствие гемолиза в первом контроле свидетельствует о том, что 0,2 МЕ антиальфастафилолизина полностью нейтрализовали гемолитическое действие дозы токсина стафилококкового в условиях испытания; отсутствие гемолиза в четвертом контроле свидетельствует о том, что «цельная» неразведенная надосадочная жидкость не вызывает гемолиза эритроцитов кролика; в третьем контроле должен произойти полный гемолиз эритроцитов.

В пробирках опытного ряда признаков гемолиза не должно быть.

Наличие признаков гемолиза в опытном ряду означает присутствие в надосадочной жидкости свободного стафилококкового анатоксина, который связывает антиальфастафилолизин, и оставшийся свободным токсин стафилококковый вызывает гемолиз эритроцитов кролика.

Пример расчета: в 1 пробирке опытного ряда (неразведенная надосадочная жидкость) зафиксирован почти полный гемолиз (+++). Это означает, что в 1 мл надосадочной жидкости содержится 0,1 ЕС стафилококкового анатоксина, т.к. 0,1 ЕС стафилококкового анатоксина связался с 0,1 МЕ антиальфастафилолизина, а оставшийся свободным токсин стафилококковый вызвал гемолиз эритроцитов кролика.

Примечание

Приготовление 15 % взвеси эритроцитов кролика и определение Lh токсина в условиях испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания антиальфастафилолизина (специфических антител) в лекар-

ственных препаратах из крови человека и животных».

Формальдегид. Не более 30 мкг/мл. Испытание проводят по ОФС «Количественное определение формальдегида в биологических лекарственных препаратах».

Консерванты. Тиомерсал (если нет других указаний в нормативной документации). Содержание тиомерсала должно быть от 80 до 120 мкг/мл. Испытание проводят по ОФС «Количественное определение тиомерсала в биологических лекарственных препаратах».

Сорбенты. Алюминия гидроксид (если нет других указаний в нормативной документации). Содержание ионов алюминия должно быть от 0,9 до 1,3 мг/мл. Испытание проводят по ОФС «Определение ионов алюминия в сорбированных биологических лекарственных препаратах».

Показатели, которые отражают качество конечного продукта, но не могут быть определены, должны быть определены на промежуточных стадиях производства, что также должно быть указано в нормативной документации.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственны средств» и ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.

Анатоксин стафилококковый очищенный, раствор для подкожного введения	ФС.3.3.1.0006.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на анатоксин стафилококковый очищенный, раствор для подкожного введения, который представляет собой токсин стафилококковый, обезвреженный формалином при нагревании и очищенный от балластных белков способом, гарантирующим полную детоксикацию и отсутствие возможности реверсии токсичности, при сохранении антигенной и иммуногенной активности.

Препарат не содержит консервантов и антибиотиков.

При подкожном введении анатоксин стафилококковый очищенный вызывает образование специфических антител (антитоксинов) против экзотоксина стафилококкового.

Область применения – специфическая иммунотерапия острой и хронической (в стадии обострения) стафилококковой инфекции у взрослых.

ПРОИЗВОДСТВО

В процессе производства анатоксина стафилококкового очищенного используют штамм *Staphylococcus aureus* О15 (или другой штамм стафилококка, обладающий аналогичными свойствами), который депонирован в официальной коллекции, происхождение и история которого документированы.

При культивировании на жидких питательных средах штамм должен образовывать токсин стафилококковый (синонимы: экзотоксин, альфатоксин,

альфастафилолизин). Метод культивирования должен обеспечивать высокую продукцию токсина, сохранять гемолитические свойства штамма и исключать контаминацию штамма посторонней микрофлорой. Токсинсодержащая культуральная жидкость, освобожденная от микробных клеток и продуктов их распада, должна содержать токсин стафилококковый с гемолитической активностью не менее 500 DHM (минимальная гемолитическая доза) и иметь Lh (лимит гемолитического действия) токсина не более 0,4 мл. Способ детоксикации токсина стафилококкового должен гарантировать отсутствие токсичности и возможность ее реверсии при сохранении антигенной (не менее 2 ЕС/мл) и иммуногенной (способность вызывать образование специфических антител) активности анатоксина стафилококкового.

Производственный штамм. Должен содержать следующую информацию: наименование штамма(ов); место их депонирования; морфологическую характеристику; при необходимости допустимое количество пассажей и методику их проведения с указанием субстрата и условий культивирования; дополнительные к паспортным данным требования к характеристикам штаммов.

Для характеристики анатоксина стафилококкового очищенного, раствора для подкожного введения, определяют: pH, прозрачность, цветность, стерильность, аномальную токсичность, специфическую безвредность, специфическую активность, антигенную активность, содержание формальдегида.

Показатели, которые отражают качество конечного продукта, но не могут быть определены, должны быть определены на промежуточных стадиях производства, что должно быть отражено в нормативной документации.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачная жидкость бесцветная или светло-желтого цвета. Определяют визуально.

Подлинность. Должен вызывать образование антител к токсину ста-

филококковому. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания антиальфастафилолизина (специфических антител) в препаратах крови человека и животных».

Прозрачность. Должен быть прозрачным. Определение проводят визуально.

Цветность. Не должен быть окрашен более эталона Y_6. Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

Извлекаемый объём. Не менее номинального. Нормативные требования указывают в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH. От 6,2 до 7,4, если нет других указаний в нормативной документации. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Стерильность. Препарат должен быть стерильным. Определение проводят методом прямого посева в соответствии с ОФС «Стерильность».

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичным. Белым мышам (5 животным) массой 18–20 г препарат вводят внутрибрюшинно по 0,5 мл, 2 морским свинкам массой 250–300 г подкожно по 2 мл.

Препарат считают выдержавшим испытание, если:

- в течение 7 сут наблюдения все животные остались живы и ни у одного из животных не были выявлены видимые признаки заболевания;
- ни у одного из животных не отмечена потеря массы тела;
- ни у одной морской свинки в месте введения препарата не развился абсцесс или некроз.

Если в течение периода наблюдения регистрируют гибель хотя бы 1

животного, заболевание, уменьшение массы тела или повреждение в месте инъекции, испытание повторяют на удвоенном количестве животных при тех же условиях учета опыта. Повторное испытание считают удовлетворительным, если препарат отвечает вышеперечисленным требованиям.

Специфическая безвредность. Препарат должен быть безвредным.

Кроликам (2 животным) массой 2 – 2,5 кг препарат в дозе 3 мл вводят подкожно в боковую поверхность тела и в той же дозе – внутривенно в краевую вену уха.

Препарат считают выдержавшим испытание, если в течение 5 сут наблюдения кролики остаются здоровыми и в местах введения препарата отсутствуют явления некроза тканей.

Примечание

Для проведения исследования специфической безвредности и специфической активности (иммуногенности) используют кроликов, у которых в 1 мл сыворотки крови содержится не более 0,125 МЕ (Международных единиц) антиальфастафилолизина. Определение проводят по ОФС «Определение содержания антиальфастафилолизина (специфических антител) в лекарственных препаратах из сыворотки крови человека и животных».

Специфическая активность (иммуногенность). Должен вызывать образование специфических антител при подкожном введении (содержание антиальфастафилолизина (специфических антител) в сыворотке крови иммунизированных кроликов должно быть не менее 3 МЕ в 1 мл (среднеарифметическое значение).

Кроликам (3 животным) массой (2,0 ± 0,5) кг, признанным пригодными для проведения испытания, препарат вводят подкожно в боковую поверхность тела трехкратно с интервалом 5–6 сут в объемах 0,5; 1,0; 1,5 мл. Через 7–9 сут после последней иммунизации у кроликов берут кровь из краевой вены уха и определяют в сыворотке крови каждого животного содержание антиальфастафилолизина. Определение проводят по ОФС «Определение содержания антиальфастафилолизина (специфических антител) в лекарственных препаратах из сыворотки крови человека и животных».

Антигенная активность (антитоксинсвязывающая способность). 1 мл препарата должен содержать от 10 до 14 ЕС (единиц связывания) стафилококкового анатоксина. 1 ЕС представляет собой минимальное количество анатоксина, которое связывает 1 МЕ (Международную единицу) антиальфастафилолизина.

Метод определения антигенной активности основан на способности стафилококкового анатоксина связывать специфические антитела (антиальфастафилолизин) и на способности антител нейтрализовать гемолитические свойства токсина стафилококкового.

Для постановки реакции используют следующие ингредиенты:

– испытуемый анатоксин стафилококковый;

– стандартный образец (СО) антиальфастафилолизина с установленным содержанием стафилококковых антител (МЕ/мл);

– токсин стафилококковый, гемолитические свойства которого характеризуются величиной Lh (лимит гемолитического действия – минимальное количество токсина стафилококкового, которое, будучи связано с 1 МЕ антиальфастафилолизина, вызывает почти полный (+++) гемолиз эритроцитов кролика);

– 15 % взвесь эритроцитов кролика;

– 0,9 % раствор натрия хлорида.

Определение антитоксинсвязывающей способности анатоксина стафилококкового сопровождается 4 контролями**.**

1 контроль – служит для коррекции учета результатов опытного ряда, т.к. в нем определяется количество МЕ (Международных единиц) антиальфастафилолизина, которое нейтрализует Lh токсина стафилококкового в условиях опыта. СО антиальфастафилолизина разводят 0,9 % раствором натрия хлорида до содержания 1 МЕ в 1 мл, разливают в ряд пробирок в объеме 0,8; 0,9; 1; 1,1; 1,2 мл и доводят общий объем в каждой пробирке 0,9 % раствором натрия хлорида до 2 мл. Таким образом, первый контроль состоит

из ряда пробирок, содержащих от 0,8 до 1,2 МЕ антиальфастафилолизина.

2 контроль – контроль «полноты» нейтрализации Lh токсина стафилококкового специфическими антителами в условиях опыта. В пробирку наливают 1 мл раствора СО антиальфастафилолизина, разведенного до содержания 2 МЕ/мл, и доводят общий объем 0,9 % раствором натрия хлорида до 2 мл.

3 контроль – контроль отсутствия спонтанного лизиса эритроцитов кролика. В пробирку вносят 2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида.

4 контроль – контроль гемолитического действия токсина стафилококкового на эритроциты кролика в условиях опыта. В пробирку вносят 2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида.

Опытный ряд – испытуемый препарат разводят 0,9 % раствором натрия хлорида в 8, 10, 12, 14 и 16 раз. Переносят в пробирки по 1 мл приготовленных разведений и добавляют в них по 1 мл раствора СО антиальфастафилолизина, содержащего 2 МЕ/мл. Пробирки осторожно встряхивают и выдерживают 20 мин при температуре (20 ± 2) °С.

Затем в пробирки опытного и контрольных рядов (кроме третьего) добавляют токсин стафилококковый в объеме Lh, установленном в день проведения испытания. Все пробирки встряхивают и выдерживают 20 мин при температуре (20 ± 2) °С. Далее в каждую пробирку добавляют по 0,1 мл свежеприготовленной 15 % взвеси эритроцитов, пробирки вновь встряхивают и выдерживают в течение 1 ч при температуре (37 ± 1) °С, а затем – 1 ч при температуре (20 ± 2) °С.

Результаты учитывают визуально по степени гемолиза эритроцитов:

«++++» – полный гемолиз (прозрачная ярко окрашенная жидкость); «+++» – почти полный гемолиз (опалесцирующая окрашенная жидкость);

«++» – частичный гемолиз (надосадочная жидкость,– окрашена);

«+» – слабый гемолиз (надосадочная жидкость,– слегка окрашена);

«−» – отсутствие гемолиза (надосадочная жидкость,– прозрачная, бесцветная).

Учет результатов опыта начинают с определения результатов контроля.

Во втором и третьем контроле гемолиз эритроцитов должен отсутствовать. Отсутствие гемолиза во втором контроле свидетельствует, о том, что антиальфастафилолизин в дозе 2 МЕ полностью нейтрализовал гемолитическое действие дозы токсина стафилококкового в опыте; в четвертом контроле должен произойти полный гемолиз эритроцитов.

Учет результатов опытного ряда проводят в сравнении с результатами первого контрольного ряда–учитывают первые пробирки, в которых произошел почти полный гемолиз «+++».

При оптимальных условиях опыта почти полный гемолиз «+++» должен произойти в пробирке контрольного ряда, содержащей 1 МЕ антиальфастафилолизина. В той пробирке опытного ряда, в которой зафиксирован также почти полный гемолиз «+++», вызываемый оставшимся свободным стафилококковым токсином, испытуемый анатоксин связал 1 МЕ антиальфастафилолизина и, следовательно, в ней содержится 1 ЕС (единица связывания) анатоксина.

Антигенная активность (антитоксическая способность) (АС) стафилококкового анатоксина, выраженная в единицах связывания (ЕС), рассчитывается по формуле:

$$АС = n \cdot (2 - a),$$

где: n – кратность разведения испытуемого анатоксина в опыте;

2 – количество МЕ антиальфастафилолизина в опыте;

a – количество МЕ антиальфастафилолизина, затраченное на нейтрали-зацию дозы токсина стафилококкового в первом контрольном ряду;

$(2 - a)$ – количество МЕ антиальфастафилолизина, связанное испытуемым анатоксином в условиях опыта, являющееся эквивалентом количества единиц связывания (ЕС) анатоксина в опыте.

Если почти полный гемолиз «+++» произошел в пробирке контрольного ряда, содержащей 1 МЕ антиальфастафилолизина, и аналогичный резуль-

тат зафиксирован в пробирке опытного ряда, содержащей испытуемый анатоксин, разведенный в 12 раз, следовательно, в 1 мл испытуемого анатоксина содержится 12·(2–1) =12 ЕС.

Если почти полный гемолиз «+++» произошел в пробирке контрольного ряда, содержащей 0,9 МЕ антиальфастафилолизина, и аналогичный результат получен в пробирке опытного ряда, содержащей испытуемый анатоксин, разведенный в 10 раз, то 1 мл испытуемого анатоксина содержит 10·(2–0,9) = 10·1,1 = 11 ЕС.

Если почти полный гемолиз «+++» произошел в пробирке контрольного ряда, содержащей 1,1 МЕ антиальфастафилолизина, и аналогичный результат зафиксирован в пробирке опытного ряда, содержащей анатоксин, разведенный в 14 раз, то 1 мл испытуемого анатоксина содержит 14·(2–1,1) = 14·0,9 = 12,6 ЕС.

Примечание

Приготовление 15 % взвеси эритроцитов кролика и определение величины Lh токсина проводят по ОФС «Определение содержания антиальфастафилолизина (специфических антител) в лекарственных препаратах из сыворотки крови человека и животных».

Формальдегид. Не более 30 мкг/мл. Испытание проводят по ОФС «Количественное определение формальдегида в биологических лекарственных препаратах».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственны средств» и ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.

Анатоксин столбнячный адсорбированный (АС-анатоксин)	ФС.3.3.1.0007.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на анатоксин столбнячный адсорбированный (АС-анатоксин), который представляет собой столбнячный анатоксин, полученный из столбнячного экзотоксина путем обезвреживания формальдегидом при нагревании, очищенный и адсорбированный на алюминия гидроксиде или другом разрешенном к применению минеральном сорбенте. АС-анатоксин предназначен для специфической профилактики столбняка.

ПРОИЗВОДСТВО

Все этапы производства АС-анатоксина должны быть валидированы с целью подтверждения установленных требований и должны гарантировать безопасность его применения.

При производстве столбнячного анатоксина используют штаммы/штамм *Clostridium tetani*, полученные и депонированные в Государственной коллекции. Микробные клетки культивируют на жидких питательных средах, обеспечивающих высокую продукцию столбнячного токсина. Методы культивирования должны гарантировать сохранение свойств штаммов и предотвращать их контаминацию. Токсинсодержащую культуральную жидкость, освобожденную от микробных клеток и продуктов их распада, проверяют на стерильность, pH и содержание токсина. Для производства столбнячного анатоксина используют культуральную среду с активностью токсина не ниже 15 $L+/_{100}$ в 1 мл. Детоксикация столбнячного токсина должна обес-

печивать сохранение антигенной активности анатоксина и гарантировать его безопасность: отсутствие остаточной токсичности (специфическая безопасность) и реверсии токсических свойств.

Для характеристики очищенного столбнячного анатоксина определяют его pH, специфическую (антигенную) активность, содержание общего и белкового азота, антигенную чистоту (удельную активность).

Показатели, которые влияют на качество, но не могут быть определены в конечном продукте, должны быть проверены на промежуточных стадиях производства, что должно быть отражено в нормативной документации.

Столбнячный анатоксин должен быть очищен от примесей, вызывающих побочные реакции при введении человеку. Для производства АС-анатоксина можно использовать только стерильный и безопасный столбнячный анатоксин со специфической (антигенной) активностью не ниже 200 ЕС/Lf в 1 мл и антигенной чистотой не менее 1000 ЕС (или Lf) на мг белкового азота.

Производственные штаммы**.** Раздел должен содержать следующую информацию: наименование штаммов; место их депонирования; допустимое количество пассажей (при необходимости) и методику их проведения с указанием субстрата культивирования; при необходимости – дополнительные к паспортным данным требования к характеристикам штаммов.

Прививочная доза (0,5 мл) содержит 10 ЕС столбнячного анатоксина. В состав лекарственного средства может входить антимикробный консервант.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Опалесцирующая жидкость белого цвета, которая может иметь сероватый или желтоватый оттенок. При отстаивании она разделяется на рыхлый осадок белого или белого с сероватым или желтоватым оттенком цвета, легко диспергирующийся при встряхивании, и прозрачную бесцветную надосадочную жидкость. Испытания проводят визуально в проходящем свете.

Подлинность. Должен обладать специфической (иммуногенной) активностью, обеспечивая защиту от действия столбнячного токсина (раздел «Специфическая активность»). В нормативной документации производителя могут быть указаны альтернативные методы, подтверждающие наличие в лекарственном средстве столбнячного анатоксина, обладающего антигенной активностью.

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH. Значения pH указывают в нормативной документации. Испытания проводят потенциометрическим методом с неразведенным АС-анатоксином в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Проходимость через иглу. Гомогенная взвесь, диспергированная путем встряхивания, должна свободно проходить в шприц через иглу 0,8· 40, если нет иных указаний в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Суспензии».

Время седиментационной устойчивости. После встряхивания и получения гомогенной взвеси не должно наблюдаться полного расслаивания в течение не менее 1 мин, если нет других указаний в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Инъекционные лекарственные формы. Лекарственные средства для парентерального применения».

Стерильность. Должен быть стерильным. Испытания проводят методами прямого посева или мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность». Для контроля используют тиогликолевую среду. Посевы инкубируют при температуре и 20 – 25 ºС и 30 – 35 ºС.

Аномальная токсичность. Должен быть нетоксичным. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Белым мышам препарат вводят внутрибрюшинно по 1 мл, морским свинкам – подкожно по

5 мл (по 2,5 мл в оба бока). За животными наблюдают 7 сут. В течение указанного времени не должны наблюдаться гибель животных и потеря массы тела.

Специфическая безопасность. Должен быть безопасным при подкожном введении 5 морским свинкам массой (300 ± 50) г 10 прививочных доз для человека (по 2,5 мл в бок и бедро). Срок наблюдения 21 сут. В течение указанного времени все животные должны оставаться живыми, без симптомов столбняка и потери массы тела. В случае гибели 1 животного или потери массы тела хотя бы одним из животных от неспецифических причин испытание повторяют. Если при повторном испытании установлена гибель более 1 животного, лекарственный препарат считают не соответствующим требованиям.

Специфическая (иммуногенная) активность. Прививочная доза (0,5 мл) для человека должна обладать активностью не ниже 40 МЕ. Определение проводят в соответствии с ОФС «Иммуногенность адсорбированного столбнячного анатоксина».

Полнота сорбции. В 1 мл надосадочной жидкости АС-анатоксина содержание неадсорбированного столбнячного анатоксина не должно превышать 0,1 ЕС, если нет иных указаний в нормативной документации производителя. Полноту сорбции определяют путем индикации антигена в надосадочной жидкости с помощью реакции антитоксинсвязывания в соответствии с ОФС «Определение содержания столбнячного анатоксина в реакции антитоксинсвязывания», если нет иных указаний в нормативной документации.

Формальдегид. Не более 200 мкг/мл. Определение проводят колориметрическим методом в соответствии с ОФС «Количественное определение формальдегида в биологических лекарственных препаратах».

Консерванты. Тиомерсал**.** Концентрация консерванта не должна быть ниже минимально эффективной и не должна превышать указанную на упаковке более чем на 15 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение тиомерсала в биологических лекарственных пре-

паратах». Не рекомендуется использование консервантов при производстве лекарственных препаратов, выпускаемых в однодозовой расфасовке.

Сорбенты. Алюминия гидроксид. Не более 1,1 мг/мл алюминия(III), если в нормативной документации нет иных указаний. Определение проводят комплексонометрическим методом в соответствии с ОФС «Определение ионов алюминия в сорбированных биологических лекарственных препаратах».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственны средств» и ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С.

Трианатоксин адсорбированный	ФС.3.3.1.0008.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на трианатоксин адсорбированный, который представляет собой смесь ботулинических анатоксинов типов А, В и Е, полученных из соответствующих экзотоксинов ботулизма путем обезвреживания формальдегидом при нагревании, которые адсорбированы на алюминия гидроксиде или другом разрешенном к применению минеральном сорбенте.

Трианатоксин предназначен для специфической профилактики ботулизма.

ПРОИЗВОДСТВО

Ботулинические анатоксины типов А, В и Е получают путем детоксикации соответствующих экзотоксинов.

Для получения ботулинических токсинов используют высокотоксигенные штаммы Clostridium botulinum, продуцирующие ботулотоксины типов А, В и Е, полученные и депонированные в Государственной коллекции. Микробные клетки культивируют на жидких питательных средах, обеспечивающих высокую степень токсинообразования.

Прививочная доза трианатоксина (1 мл) содержит 5 ЕС ботулинического анатоксина типа А и по 3 ЕС ботулинических анатоксинов типов В и Е. В состав лекарственного средства может входить антимикробный консервант.

Методы детоксикации ботулинических экзотоксинов должны обеспечивать сохранение антигенной активности полученных анатоксинов и гаран-

тировать их безопасность – отсутствие остаточной токсичности и реверсии токсических свойств.

Ботулинические анатоксины должны быть максимально очищены от балластных примесей.

Производственные штаммы. Должны содержать следующую информацию: наименование штаммов; место их депонирования; допустимое количество пассажей (при необходимости) и методику их проведения с указанием условий культивирования; при необходимости – дополнительные к паспортным данным требования к характеристикам штаммов.

Показатели, которые влияют на качество, но не могут быть определены в конечном продукте, должны быть проверены на промежуточных стадиях производства, что должно быть отражено в нормативной документации производителя.

ИСПЫТАНИЕ БОТУЛИНИЧЕСКИХ АНАТОКСИНОВ типов А, В и Е НА СТАДИЯХ ПРОИЗВОДСТВА

Антигенная активность. Антигенную активность ботулинических анатоксинов выражают в единицах связывания (ЕС). Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания анатоксинов/токсинов в реакции антитоксинсвязывания». Для получения трианатоксина используют очищенные ботулинические анатоксины с активностью не ниже 200 ЕС/мл для анатоксина типа А, 80 ЕС/мл для анатоксина типа В и 20 ЕС/мл для анатоксина типа Е.

Удельная активность. Ботулинические анатоксины типа А, В и Е должны обладать удельной активностью соответственно не ниже 1000, 500 и 150 ЕС на мг белкового азота.

Специфическая безопасность. В течение 21 сут наблюдения у животных не должно наблюдаться признаков специфической интоксикации и некрозов в месте инъекции.

5 морским свинкам с массой тела 300–350 г вводят подкожно не менее 600 ЕС ботулинического анатоксина типа А, 120 ЕС ботулинического анатоксина типа В или 60 ЕС ботулинического анатоксина типа Е в объеме 5 мл (по 2,5 мл в область правого и левого бока). К 21 суткам наблюдения не должно наблюдаться потери массы тела. Если более одного животного гибнут по причине, не связанной со специфической интоксикацией, испытание повторяют на удвоенном количестве животных. Если при повторном испытании гибнет более одного животного, анатоксин считают не прошедшим испытание.

Реверсия токсичности. Анатоксины, выдержанные при температуре (37±1) ºС и при температуре от 2 до 8 ºС не должны вызывать симптомов специфической интоксикации.

Готовят растворы ботулинических токсинов , содержащие в 1 мл 5 ЕС ботулинического токсина типа А, 3 ЕС ботулинических токсинов типов В или Е и консервант (при его наличии) в 0,9 % растворе натрия хлорида в концентрации, принятой для готового продукта. Полученные смеси делят на две части и выдерживают в течение 42 сут: первую – при температуре (37±1) ºС, вторую – при температуре от 2 до 8 ºС. Каждый образец вводят внутрибрюшинно 5 белым мышам с массой тела (17 ± 1) г в объеме 1 мл. За животными наблюдают в течение 4 сут.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Опалесцирующая жидкость белого цвета; может иметь сероватый или желтоватый оттенок. При отстаивании разделяется на рыхлый осадок белого или белого с сероватым или желтоватым оттенком цвета, легко разбивающийся при встряхивании на прозрачную бесцветную надосадочную жидкость. Испытания проводят визуально в проходящем свете.

Подлинность. Должен содержать ботулинические анатоксины типов А, В и Е, обладающие специфической активностью, обеспечивая защиту от

действия соответствующих токсинов (раздел «Специфическая активность»). В нормативной документации производителя могут быть указаны альтернативные методы, подтверждающие наличие в лекарственном средстве ботулинических анатоксинов.

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH. От 6,0 до 7,0, если в нормативной документации нет других указаний. Испытания проводят потенциометрическим методом с неразведенным трианатоксином в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Проходимость через иглу. Гомогенная взвесь, диспергированная путем встряхивания, должна свободно проходить в шприц через иглу 0,8· 40, если нет иных указаний в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Суспензии».

Время седиментационной устойчивости. После встряхивания и получения гомогенной взвеси не должно наблюдаться полного расслаивания в течение не менее 1 мин, если нет других указаний в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Инъекционные лекарственные формы. Лекарственные средства для парентерального применения».

Стерильность. Должен быть стерильным. Испытания проводят методами прямого посева в соответствии с ОФС «Стерильность». Для контроля используют тиогликолевую среду. Посевы инкубируют при температуре 20 – 25 ºС и 30 – 35 ºС.

Аномальная токсичность. Должен быть нетоксичным. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Белым мышам препарат вводят внутрибрюшинно по 1 мл, морским свинкам – подкожно по 5 мл (по 2,5 мл в оба бока).

Специфическая безопасность. Должен быть безопасным. Испытания проводят при подкожном введении 5 морским свинкам массой (325 ± 25) г 5 прививочных доз для человека (по 2,5 мл в оба бока). Через 21 сут все животные должны остаться живыми без признаков специфической интоксикации. В случае гибели или потери массы тела 1 из животных от неспецифических причин испытание повторяют. Если при повторном испытании гибнет более 1 животного, лекарственный препарат не соответствует требованиям.

Специфическая (иммуногенная) активность. Должен обладать иммуногенной активностью в отношении каждого из анатоксинов, входящих в его состав. Выживаемость иммунизированных мышей при летальном заражении должна составлять не менее 70 % для каждого компонента препарата. Условия проведения испытания по оценке иммуногенной активности компонентов препарата трианатоксин представлены в табл 1.

Таблица 1– **Схема опыта по испытанию специфической (иммуногенной) активности трианатоксина**

Компонент трианатоксина	Иммунизирующая доза		Разрешающая доза токсина/ способ введения
	ЕС	мл	
Анатоксин ботулинический типа А	5	1,0	25 LD_{50} /внутривенно
Анатоксин ботулинический типа В	1,2	0,4	50 LD_{50} /внутривенно
Анатоксин ботулинический типа Е	1,2	0,4	25 LD_{50} /внутривенно

Испытания специфической активности проводят на мышах (самцах и самках) линии Balb/c массой (17 ± 1) г. Иммунизацию проводят внутрибрюшинно группам не менее чем из 10 животных. Разрешающие дозы токсинов вводят животным спустя 21 сут после иммунизации. Опыты сопровождают контролем активности токсинов, которые вводят внутривенно по 0,5; 1 и 2 LD_{50} каждого токсина не менее чем 4 животным из той же партии. Результаты оценивают ежедневно в течение 4 сут. Результаты опыта учитывают, если при контроле активности токсинов введение дозы 2 LD_{50} вызвало гибель 100 %, а дозы, равной 1 LD_{50}, – не менее 50 % мышей к концу срока наблюдения.

Полнота сорбции. В 1 мл надосадочной жидкости содержание неадсорбированного ботулинического анатоксина типа А должно быть не более 0,25 ЕС, типов В и Е – 0,15 ЕС, если нет других указаний в нормативной документации. Полноту сорбции определяют путем индикации неадсорбированных ботулинических анатоксинов в надосадочной жидкости препарата. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания анатоксинов в реакции антитоксинсвязывания».

Формальдегид. Не более 100 мкг/мл. Определение проводят колориметрическим методом в соответствии с ОФС « Количественное определение формальдегида в биологических лекарственных препаратах».

Консерванты. Тиомерсал. Концентрация консерванта не должна быть ниже минимально эффективной и не превышать, указанную на упаковке более чем на 15 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение тиомерсала в биологических лекарственных препаратах». Не рекомендуется использование консервантов при производстве лекарственных препаратов, выпускаемых в однодозовой расфасовке.

Сорбенты. Алюминия гидроксид. Содержание алюминия(III) должно быть не более 1,2 мг/мл, если в нормативной документации нет других указаний. Определение проводят комплексонометрическим методом в соответствии с ОФС «Определение ионов алюминия в сорбированных биологических лекарственных препаратах».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственны средств» и ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С.

Тетраанатоксин адсорбированный	ФС.3.3.1.0009.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на тетраанатоксин адсорбированный, который представляет собой смесь ботулинических анатоксинов типов А, В и Е и столбнячного анатоксина, полученных из соответствующих экзотоксинов путем обезвреживания формальдегидом при нагревании, которые адсорбированы на алюминия гидроксиде или другом разрешенном к применению минеральном сорбенте.

Тетраанатоксин предназначен для специфической профилактики ботулизма и столбняка.

ПРОИЗВОДСТВО

Ботулинические анатоксины типов А, В и Е и столбнячный анатоксин получают путем детоксикации соответствующих токсинов.

Для получения ботулинических и столбнячного токсинов используют высокотоксигенные штаммы *Clostridium botulinum*, продуцирующие ботулотоксины типов А, В и Е, и *Clostridium tetani*, полученные и депонированные в Государственной коллекции. Микробные клетки культивируют на жидких питательных средах, обеспечивающих высокую степень токсинообразования.

Производственные штаммы. Раздел должен содержать следующую информацию: наименование штаммов; место их депонирования; допустимое количество пассажей (при необходимости) и методику их проведения с указанием условий культивирования; при необходимости – дополнительные к паспортным данным требования к характеристикам штаммов.

Прививочная доза тетраанатоксина (1 мл) содержит 5 ЕС ботулинического анатоксина типа А, по 3 ЕС ботулинических анатоксинов типов В и Е и 2,5 ЕС столбнячного анатоксина. В состав лекарственного средства может входить антимикробный консервант.

Методы детоксикации ботулинических и столбнячных экзотоксинов должны обеспечивать сохранение антигенной активности полученных анатоксинов и гарантировать их безопасность – отсутствие остаточной токсичности и реверсии токсических свойств.

Ботулинические и столбнячный анатоксины должны быть максимально очищены от балластных примесей.

Показатели, которые влияют на качество, но не могут быть определены в конечном продукте, должны быть проверены на промежуточных стадиях производства, что должно быть отражено в нормативной документации.

ИСПЫТАНИЕ БОТУЛИНИЧЕСКИХ АНАТОКСИНОВ типов А, В и Е и СТОЛБНЯЧНОГО АНАТОКСИНА НА СТАДИЯХ ПРОИЗВОДСТВА

Антигенная активность. Антигенную активность ботулинических и столбнячного анатоксинов выражают в единицах связывания (ЕС). Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания анатоксинов/токсинов в реакции антитоксинсвязывания». Для получения тетраанатоксина используют очищенные ботулинические анатоксины с активностью не ниже 200 ЕС/мл для анатоксина типа А, 80 ЕС/мл для анатоксина типа В и 20 ЕС/мл для анатоксина типа Е, для столбнячного анатоксина не ниже 200 ЕС/мл.

Удельная активность. Ботулинические анатоксины типа А, В и Е должны обладать удельной активностью соответственно не ниже 1000, 500 и 150 ЕС на мг белкового азота. Столбнячный анатоксин должен обладать удельной активностью не ниже 1000 ЕС на мг белкового азота.

Специфическая безопасность столбнячного анатоксина. В течение 21 сут наблюдения у животных не должно наблюдаться признаков столбняка

(ригидность лапки, искривление позвоночника, или сочетание указанных признаков) и потери массы тела.

5 морским свинкам с массой тела 250–350 г вводят подкожно 1500 ЕС столбнячного анатоксина (суммарно в бок и внутреннюю поверхность верхней трети бедра). Если более одного животного гибнет по причине, не связанной со специфической интоксикацией, испытание повторяют. Если при повторном испытании гибнет более одного животного, столбнячный анатоксин считают не прошедшим испытание.

Специфическая безопасность ботулинических анатоксинов. В течение 21 сут наблюдения у животных не должно наблюдаться признаков специфической интоксикации и некрозов в месте инъекции.

5 морским свинкам с массой тела 300–350 г вводят подкожно не менее 600 ЕС ботулинического анатоксина типа А, 120 ЕС ботулинического анатоксина типа В или 60 ЕС ботулинического анатоксина типа Е в объеме 5 мл (по 2,5 мл в область правого и левого бока). К 21 суткам наблюдения не должно наблюдаться потери массы тела. Если более одного животного гибнут по причине, не связанной со специфической интоксикацией, испытание повторяют на удвоенном количестве животных. Если при повторном испытании гибнет более одного животного, анатоксин считают не прошедшим испытание.

Реверсия токсичности ботулинических анатоксинов. Анатоксины, выдержанные при температуре (37±1) ºС и при температуре от 2 до 8 ºС не должны вызывать симптомов специфической интоксикации.

Готовят растворы ботулинических токсинов , содержащие в 1 мл 5 ЕС ботулинического токсина типа А, 3 ЕС ботулинических токсинов типов В или Е и консервант (при его наличии) в 0,9 % растворе натрия хлорида в концентрации, принятой для готового продукта. Полученные смеси делят на две части и выдерживают в течение 42 сут: первую – при температуре (37±1) ºС, вторую – при температуре от 2 до 8 ºС. Каждый образец вводят внутри-

брюшинно 5 белым мышам с массой тела (17 ± 1) г в объеме 1 мл. За животными наблюдают в течение 4 сут.

Реверсия токсичности столбнячного анатоксина. В течение 21 сут наблюдения у животных не должно наблюдаться признаков столбняка. Готовят раствор, содержащий столбнячный анатоксин, консервант (при его наличии) в 0,9 % растворе натрия хлорида в концентрации, принятой для готового продукта. Полученную смесь делят на две части и выдерживают в течение 42 сут: первую – при температуре (37±1) ºС, вторую – при температуре от 2 до 8 ºС. Каждый образец вводят подкожно 5 морским свинкам с массой тела 250-350 г в объеме 5 мл (по 2,5 мл в оба бока). Наличие признаков столбняка в течение 21 сут наблюдения за животными свидетельствует о присутствии в пробе столбнячного токсина.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Опалесцирующая жидкость белого цвета; может иметь сероватый или желтоватый оттенок. При отстаивании разделяется на рыхлый осадок белого или белого с сероватым или желтоватым оттенком цвета, легко разбивающийся при встряхивании, и прозрачную бесцветную надосадочную жидкость. Испытания проводят визуально в проходящем свете.

Подлинность. Должен содержать анатоксины – ботулинические типов А, В и Е и столбнячный, обладающие специфической активностью, обеспечивая защиту от действия соответствующих токсинов (раздел «Специфическая активность»). Для определения подлинности могут быть использованы другие валидированные методы, указанные в нормативной документации.

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH. От 6,0 до 7,0, если в нормативной документации нет других указаний. Испытания проводят потенциометрическим методом с неразведенным тетраанатоксином в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Проходимость через иглу. Гомогенная взвесь, диспергированная путем встряхивания, должна свободно проходить в шприц через иглу 0,8· 40, если нет иных указаний в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Суспензии».

Время седиментационной устойчивости. После встряхивания и получения гомогенной взвеси не должно наблюдаться полного расслаивания в течение не менее 1 мин, если нет других указаний в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Инъекционные лекарственные формы. Лекарственные средства для парентерального применения».

Стерильность. Должен быть стерильным. Испытания проводят методами прямого посева в соответствии с ОФС «Стерильность». Для контроля используют тиогликолевую среду. Посевы инкубируют при температуре 20 – 25 ºС и 30 – 35 ºС.

Аномальная токсичность. Должен быть нетоксичным. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Белым мышам препарат вводят внутрибрюшинно по 1 мл, морским свинкам – подкожно по 5 мл (по 2,5 мл в оба бока).

Специфическая безопасность. Должен быть безопасным. Испытания проводят при подкожном введении 5 морским свинкам массой (325 ± 25) г 5 прививочных доз для человека (по 2,5 мл в оба бока). Через 21 сут все животные должны остаться живыми без признаков специфической интоксикации. В случае гибели или потери массы тела 1 из животных от неспецифических причин испытание повторяют. Если при повторном испытании гибнет более 1 животного, лекарственный препарат не соответствует требованиям.

Специфическая (иммуногенная) активность. Должен обладать иммуногенной активностью в отношении каждого из анатоксинов, входящих в

его состав. Выживаемость иммунизированных мышей при летальном заражении должна составлять не менее 70 % для каждого компонента препарата. Условия проведения испытания по оценке иммуногенной активности компонентов препарата представлены в табл.

Таблица – **Схема опыта по испытанию специфической (иммуногенной) активности тетраанатоксина**

Компонент тетраанатоксина	Иммунизирующая доза		Разрешающая доза токсина/ способ введения
	ЕС	мл	
Анатоксин ботулинический типа А	5	1,0	25 LD_{50} /внутривенно
Анатоксин ботулинический типа В	1,2	0,4	50 LD_{50} /внутривенно
Анатоксин ботулинический типа Е	1,2	0,4	25 LD_{50} /внутривенно
Анатоксин столбнячный	2,0	0,8	100 LD_{50} /подкожно

Испытания специфической активности ботулинических анатоксинов типов А, В и Е, входящих в состав тетраанатоксина, проводят на мышах линии Balb/c, столбнячного анатоксина – на белых беспородных мышах или мышах линии Balb/c (самцах и самках) массой (17 ± 1) г. Иммунизацию для оценки специфической активности ботулинических анатоксинов проводят внутрибрюшинно, столбнячного анатоксина – подкожно, в область внутренней поверхности верхней трети бедра группам из не менее чем 10 животных. Разрешающие дозы токсинов вводят животным внутривенно спустя 21 сут после иммунизации. Опыты сопровождают контролем активности токсинов при введении по 0,5; 1 и 2 LD_{50} каждого токсина не менее чем 4 животным из той же партии. Наблюдение за животными проводят в течение 4 сут. Результаты опыта учитывают, если при контроле активности токсинов введение дозы 2 LD_{50} вызвало гибель 100 % животных, а дозы, равной 1 LD_{50} ,– не менее 50 % мышей к концу срока наблюдения.

Полнота сорбции. В 1 мл надосадочной жидкости содержание неадсорбированного ботулинического анатоксина типа А должно быть не более 0,25 ЕС, типов В и Е не более 0,15 ЕС, неадсорбированного столбнячного анатоксина – не более 0,1 ЕС, если нет других указаний в нормативной доку-

ментации.

Полноту сорбции определяют путем индикации неадсорбированных ботулинических и столбнячного анатоксинов в надосадочной жидкости препарата. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания анатоксинов/токсинов в реакции антитоксинсвязывания».

Формальдегид. Не более 100 мкг/мл. Определение проводят колориметрическим методом в соответствии с ОФС «Количественное определение формальдегида в биологических лекарственных препаратах».

Консерванты. Тиомерсал. Концентрация консерванта не должна быть ниже минимально эффективной и не превышать указанную на упаковке более чем на 15 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение тиомерсала в биологических лекарственных препаратах». Не рекомендуется использование консервантов при производстве лекарственных препаратов, выпускаемых в однодозовой расфасовке.

Сорбенты. Алюминия гидроксид. Не более 1,2 мг/мл алюминия(III), если в нормативной документации нет иных указаний. Определение проводят комплексонометрическим методом в соответствии с ОФС «Определение ионов алюминия в сорбированных биологических лекарственных препаратах».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственны средств» и ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С.

Вакцина коклюшно-дифтерийно-столбнячная адсорбированная (АКДС-вакцина)	ФС.3.3.1.0010.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину коклюшно-дифтерийно-столбнячную адсорбированную (АКДС-вакцину), которая представляет собой смесь инактивированных коклюшных клеток и обезвреженных формальдегидом при нагревании дифтерийного и столбнячного токсинов, очищенных и адсорбированных на алюминия гидроксиде или другом разрешенном к применению минеральном сорбенте.

В состав лекарственного средства может входить антимикробный консервант.

АКДС-вакцина предназначена для специфической профилактики коклюша, дифтерии и столбняка.

ПРОИЗВОДСТВО

Все этапы производства АКДС-вакцины должны быть валидированы с целью подтверждения установленных требований и должны гарантировать безопасность ее применения.

Столбнячный анатоксин

При производстве столбнячного анатоксина используют штаммы/штамм *Clostridium tetani*, полученные и депонированные в Государственной коллекции. Микробные клетки культивируют на жидких питательных средах, обеспечивающих высокую продукцию столбнячного токсина. Методы культивирования должны гарантировать сохранение свойств штаммов и предотвращать их контаминацию. Токсинсодержащую культуральную жид-

кость, освобожденную от микробных клеток и продуктов их распада, проверяют на стерильность, pH и содержание токсина. Для производства столбнячного анатоксина используют культуральную среду с активностью токсина не менее 15 $L+/_{100}$ в 1 мл. Детоксикация столбнячного токсина должна обеспечивать сохранение антигенной активности анатоксина и гарантировать его безопасность – отсутствие остаточной токсичности (специфическая безопасность) и реверсии токсических свойств. Столбнячный анатоксин должен быть очищен от примесей, вызывающих побочные реакции при введении человеку. Для характеристики очищенного столбнячного анатоксина определяют pH, специфическую (антигенную) активность, содержание общего и белкового азота, антигенную чистоту (удельную активность).

Дифтерийный анатоксин

При производстве дифтерийного анатоксина используют токсигенный штамм *Corynebacterium diphtheriae*, полученный и депонированный в Государственной коллекции. Микробные клетки культивируют на жидких питательных средах, обеспечивающих высокую продукцию дифтерийного токсина. Методы культивирования должны гарантировать сохранение свойств штамма и предотвращать его контаминацию. Токсинсодержащую культуральную жидкость, освобожденную от микробных клеток и продуктов их распада, проверяют на стерильность, pH и содержание токсина. Для производства дифтерийного анатоксина используют культуральную среду с активностью токсина не менее 80 Lf в 1 мл. Детоксикация дифтерийного токсина должна обеспечивать сохранение антигенной активности анатоксина и гарантировать его безопасность: отсутствие остаточной токсичности (специфическая безопасность) и реверсии токсических свойств. Для характеристики очищенного дифтерийного анатоксина определяют его pH, специфическую (антигенную) активность, содержание общего и белкового азота, антигенную чистоту (удельную активность). Дифтерийный анатоксин должен быть очищен от примесей, вызывающих побочные реакции при введении человеку.

Для производства АКДС-вакцины используют только стерильный и безопасный столбнячный анатоксин с удельной активностью не менее 1000 ЕС (или Lf) на мг белкового азота и только стерильный безопасный дифтерийный анатоксин, содержащий не менее 1500 Lf на мг белкового азота.

Инактивированная коклюшная суспензия

Инактивированная коклюшная суспензия (КС) представляет собой стерильную взвесь обезвреженных формальдегидом цельных микробных клеток *Bordetella pertussis.* Для производства КС используют штаммы, полученные и депонированные в Государственной коллекции. Производство ЕС должно быть основано на системе посевных серий. Культуры рабочих посевных серий должны обладать теми же характеристиками, что и культуры штамма, из которого была получена исходная посевная серия. Ежегодно перед использованием в производстве посевные серии должны быть проверены по морфологии, культуральным и антигенным свойствам, дермонекротической активности, вирулентности и токсичности, а также иммуногенной активности.

Определение серологических (антигенных) свойств КС. Взвесь коклюшных микробных клеток должна содержать агглютиногены 1, 2 и 3. Уровень агглютиногенов должен выявляться в реакции агглютинации соответствующими адсорбированными агглютинирующими сыворотками в титре не ниже 1:1280. При производстве КС используют штаммы *B. pertussis* (серотип 1.2.3 – 1 штамм, серотип 1.2.0 – 1 штамм, серотип 1.0.3 – 1 штамм), взятые в равных соотношениях или в соотношении 4:3:3. Содержание формальдегида в инактивированной КС не более 300 мкг/мл, тиомерсала (при его наличии) – от 85 до 115 мкг/мл.

Уровень агглютиногенов 1, 2 и 3 следует определять на стадии получения сведенной КС и перед добавлением адъюванта или объединением с другими компонентами (антигенами) комбинированных вакцин. Для определения уровня содержания агглютиногенов используют адсорбированные коклюшные сыворотки к агглютиногенам 1, 2, 3. Титром считают величину, со-

ответствующую последнему удвоенному разведению сыворотки, дающему агглютинацию, соответствующую +++.

В качестве референс-препарата используют приготовленную ранее серию КС, которая в испытании показала высокую иммуногенную активность (10 МЕ/мл и более)

Одновременно проводят контроль сыворотки и антигена в тех же объемах на отсутствие спонтанной агглютинации.

Результаты реакции агглютинации учитывают визуально до встряхивания пробирок, а затем для более точного учета – в агглютиноскопе при осторожном встряхивании осадка путем медленного наклона пробирки.

Учет результатов реакции проводят по «четырехкрестовой» системе:

«++++» – полная агглютинация: обильный плотный осадок, четко сформирован «зонтик», полное просветление надосадочной жидкости; после легкого встряхивания – крупные хлопья в прозрачной надосадочной жидкости;

«+++» – осадок большой, рыхлый, надосадочная жидкость еще прозрачна, слегка опалесцирует; после легкого встряхивания – средние хлопья в слегка опалесцирующей надосадочной жидкости;

«++» – мелкие, нестойкие хлопья, осадок небольшой, рыхлый, надосадочная жидкость непрозрачна; после легкого встряхивания – мелкие, нестойкие хлопья;

«+» – следы агглютинации: в центре небольшой осадок, надосадочная жидкость непрозрачная;

«–» – отрицательная реакция: осадка нет или небольшой компактный осадок в центре дна пробирки, взвесь равномерно мутная.

Определение специфической безопасности инактивированной КС. Полноту инактивации коклюшных микробов (специфическую безопасность) определяют в опытах на животных.

Испытуемую КС вводят внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл, содержащем 10 млрд коклюшных бактерий (прививочная доза вакцины для человека)

10 беспородным белым мышам массой 14 – 16 г. Мышам контрольной группы (10 животных) внутрибрюшинно вводят по 0,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, pH (7,0 ± 0,3), содержащего в той же концентрации консервант, который присутствует в вакцине. Для испытания используют здоровых животных одного пола из одной партии. Если используют животных обоего пола, их следует равномерно распределить по группам. Непосредственно перед введением вакцины определяют общую массу каждой группы мышей. Через 72 ч и спустя 7 сут после введения определяют общую массу каждой группы мышей. Вакцина считается безопасной, если:

а) через 72 ч общая масса тела опытных животных не ниже их исходной массы тела перед введением препаратов;

б) через 7 сут относительный прирост массы тела мышей, получивших испытуемую коклюшную суспензию, составляет не менее 60 % прироста массы тела контрольных животных.

В случае гибели за этот срок хотя бы 1 мыши или потери в массе тела, по сравнению с первоначальной, опыт повторяют на удвоенном количестве мышей с теми же требованиями. В случае гибели хотя бы 1 мыши при повторном контроле испытуемая вакцинная масса признается непригодной.

Определение дермонекротической активности. Испытание проводят на кроликах или мышах-сосунках. Коклюшная суспензия в концентрации 4 МЕ в объеме 0,2 мл при внутрикожном введении кролику не должна вызывать образования инфильтратов и развития некрозов; допускается гиперемия не более 10 мм в диаметре. В качестве контроля используют введение живой культуры в объеме 0,2 мл с минимальной концентрацией микробных клеток, вызывающей некроз размером не менее 5 мм в диаметре. Определение проводят на 2 белокожих кроликах массой 1,5–2 кг. Учет результатов проводят ежедневно в течение 4 сут.

КС, содержащая 1 МЕ в объеме 0,05 мл, при подкожном введении четырехдневным мышам-сосункам в область шеи со стороны спины не должна вызывать изменения цвета кожных покровов. В качестве положительного

контроля вводят живую коклюшную культуру, взятую в том же объеме с минимальной концентрацией микробных клеток, вызывающей кожную реакцию; в качестве отрицательного контроля – 0,05 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Каждый препарат вводят 2 животным. Реакцию учитывают в течение 24 ч. Появление сине-пурпурного окрашивания инъецированной области свидетельствует о присутствии недостаточно обезвреженного дерматонекротического токсина.

Для обоих тестов в качестве положительного контроля используют живую 2-суточную культуру тест-штамма или производственного (не подвергнутого инактивации) штамма, выращенную на среде Борде-Жангу с 30 % крови человека или КУА с 10 % крови человека.

Определение иммуногенных (защитных) свойств КС. КС с мутностью 20 МЕ должна содержать 10 МЕ активности. Определение проводят в соответствии с ОФС «Иммуногенность коклюшной суспензии и цельноклеточного коклюшного компонента комбинированных вакцин».

Для производства вакцины используют КС с концентрацией клеток от 60 до 80 МЕ в 1 мл, pH 6,8–7,4.

Показатели, которые влияют на качество, но не могут быть определены в конечном продукте, должны быть проверены на промежуточных стадиях производства, что должно быть отражено в нормативной документации.

Прививочная доза АКДС-вакцины (0,5 мл) содержит 15 Lf дифтерийного анатоксина, 5 ЕС (Lf) столбнячного анатоксина и 10 млрд клеток инактивированных коклюшных бактерий. В состав лекарственного средства может входить антимикробный консервант.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Опалесцирующая жидкость белого цвета, которая может иметь сероватый или желтоватый оттенок. При отстаивании разделяется на рыхлый осадок белого или белого с сероватым или желтоватым оттенком

цвета, легко диспергируемый при встряхивании, и прозрачную надосадочную жидкость. Испытания проводят визуально в проходящем свете.

Подлинность. Должна обладать специфической (иммуногенной) активностью, обеспечивая защиту от действия дифтерийного и столбнячного токсинов и коклюшных микробов. Определение проводят методами летального заражения, изложенными в разделе «Специфическая активность» ОФС «Иммуногенность адсорбированного столбнячного анатоксина», ОФС «Иммуногенность адсорбированного дифтерийного анатоксина» и ОФС «Иммуногенность коклюшной суспензии и цельноклеточного коклюшного компонента комбинированных вакцин». В нормативной документации производителя могут быть указаны альтернативные методы, подтверждающие наличие в лекарственном средстве дифтерийного и столбнячного анатоксинов, а также коклюшного компонента, обладающих антигенной активностью.

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

Проходимость через иглу. Гомогенная взвесь, диспергированная путем встряхивания, должна свободно проходить в шприц через иглу 0,8·40, если нет других указаний в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Суспензии».

Время седиментационной устойчивости. После встряхивания и получения гомогенной взвеси не должно наблюдаться полного расслаивания в течение не менее 1 мин, если нет других указаний в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Инъекционные лекарственные формы. Лекарственные средства для парентерального применения».

pH. От 6,8 до 7,4, если в нормативной документации производителя нет иных указаний. Испытания проводят потенциометрическим методом с неразведенной АКДС-вакциной в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Стерильность. Должна быть стерильной. Испытание проводят методом прямого посева в соответствии с ОФС «Стерильность». Для контроля используют тиогликолевую среду. Посевы инкубируют при температуре 20–25 ºС и 30–35 ºС.

Аномальная токсичность. Должна быть нетоксичной. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Белым мышам массой 14–16 г препарат вводят внутрибрюшинно по 0,5 мл, морским свинкам – подкожно по 3 мл (по 1,5 мл в оба бока). За животными наблюдают 7 сут. В течение указанного времени не должны наблюдаться гибель животных и потеря массы тела.

Специфическая безопасность. Должна быть безопасной (дифтерийный и столбнячный компоненты) при подкожном введении 5 морским свинкам массой 250–350 г 6 прививочных доз для человека (суммарно в бок и лапку). Через 30 дней все животные должны остаться живыми без симптомов столбняка, дифтерийной интоксикации и потери массы тела. В случае гибели 1 из животных или потери массы тела от неспецифических причин испытание повторяют. Если при повторном испытании гибнет более 1 животного, лекарственный препарат признают не соответствующим требованиям.

Специфическую безопасность коклюшного компонента оценивают аналогично методу, описанному для определения специфической безопасности коклюшной суспензии.

Специфическая (иммуногенная) активность. Специфическая активность 1 мл вакцины должна быть не менее 8 международных единиц (МЕ) для коклюшного (нижний предел значения доверительного интервала (P = 0,95) не менее 4 МЕ/мл), 60 МЕ для дифтерийного и 120 МЕ для столбнячного компонентов. Специфическую активность дифтерийного и столбнячного анатоксинов, входящих в состав вакцины, определяют по устойчивости иммунизированных животных к заражению соответствующими токсинами в соответствии с ОФС «Иммуногенность адсорбированного дифтерийного анатоксина» и ОФС «Иммуногенность адсорбированного столбняч

сина». Специфическую активность коклюшного компонента вакцины определяют на модели экспериментального менингоэнцефалита при внутримозговом введении иммунизированным мышам заражающей дозы тест-штамма *B. pertussis* в соответствии с ОФС «Иммуногенность коклюшной суспензии и цельноклеточного коклюшного компонента комбинированных вакцин».

Специфическую активность дифтерийного и столбнячного компонентов возможно оценивать по титру соответствующих антител в сыворотке крови иммунизированных животных в тестах с параллельным использованием стандартных образцов, калиброванных в МЕ.

Полнота сорбции. В 1 мл надосадочной жидкости содержание неадсорбированного дифтерийного анатоксина не должно превышать 1 Lf, неадсорбированного столбнячного анатоксина – 0,1 EC/Lf, если в нормативной документации нет иных указаний. Полноту сорбции определяют путем индикации неадсорбированных дифтерийного и столбнячного анатоксинов в надосадочной жидкости АКДС-вакцины. Определение содержания неадсорбированного дифтерийного анатоксина в надосадочной жидкости проводят в соответствии с ОФС «Определение концентрации анатоксинов/токсинов в реакции флокуляции», неадсорбированного столбнячного анатоксина – в соответствии с ОФС «Определение концентрации анатоксинов в реакции антитоксинсвязывания».

Формальдегид. Не более 100 мкг/мл. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение формальдегида в биологических лекарственных препаратах».

Консерванты. Тиомерсал (при наличии). Концентрация антимикробных консервантов должна быть не ниже минимально эффективной и не превышать указанную на этикетке более чем на 15%. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение тиомерсала в биологических лекарственных препаратах». Не рекомендуется использование консервантов при производстве лекарственных препаратов, выпускаемых в однодозовой расфасовке.

Сорбенты. Алюминия гидроксид. Не более 1,1 мг/мл алюминия(III), если в нормативной документации производителя нет иных указаний. Определение проводят комплексонометрическим методом в соответствии с ОФС «Определение ионов алюминия в сорбированных биологических лекарственных препаратах».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственны средств» и ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С.

Вакцина бруцеллезная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и накожного скарификационного нанесения — ФС.3.3.1.0011.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину бруцеллезную живую, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и накожного скарификационного нанесения, представляющую собой культуру живых микробов бруцеллезного вакцинного штамма *Brucella abortus* 19 ВА, высушенную методом лиофилизации в стабилизирующей среде. Вакцина предназначена для профилактики бруцеллеза и обеспечивает развитие иммунитета продолжительностью 10–12 мес, с сохранением максимальной напряженности иммунитета в течение 5–6 мес.

ПРОИЗВОДСТВО

Все этапы производства вакцины должны гарантировать соблюдение установленных надлежащих правил, а также качества лекарственного препарата, гарантирующее его безопасность для человека.

Вакцинный штамм *Brucella abortus* 19 ВА, биовар I должен иметь типичные культуральные, морфологические, биохимические и антигенные свойства; не содержать бактериофага; остаточная вирулентность для белых мышей массой (19 ± 1) г должна быть в пределах инфицирующих доз (ID_{50}) от 5 10^2 до $5 \cdot 10^5$ микробных клеток (м.к.); быть безопасным: при подкожном введении белым мышам массой (19 ± 1) г дозы $2 \cdot 10^9$ м.к не вызывать их ги-

бель в течение 6 сут наблюдения; при введении морским свинкам подкожно дозы $2 \cdot 10^9$ м.к/мл через 14 сут должен определяться от $5 \cdot 10^2$ до $5 \cdot 10^4$ м.к./мл в 1 мл взвеси селезенки; быть иммуногенным: предохранять от заражения вирулентным штаммом *B. melitensis* 565 не менее 7 из 10 морских свинок, привитых подкожно $2 \cdot 10^9$ живых м.к./мл.

Перед приготовлением производственной культуры *B. abortus* 19 ВА проводят пассаж штамма через организм морской свинки с последующим отбором типичных колоний, выросших на плотной питательной среде из посевов селезенки или регионарных лимфатических узлов.

Технология производства вакцины бруцеллезной живой предусматривает получение посевных культур *B. abortus* 19 ВА I, II, III и IV генераций; процесс накопления биомассы, выращенной для приготовления микробной взвеси с необходимой концентрацией; последующий розлив, замораживание, сублимационное высушивание, герметизацию и упаковку препарата. В зависимости от технологии приготовления вакцины в процессе производства используются стабилизаторы, разрешенные для использования при производстве иммунобиологических лекарственных препаратов: сахароза, желатин, тиомочевина, натрия глутамат моногидрат.

На стадиях приготовления посевных культур определяют pH, концентрацию м.к., отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов, проводят контроль посевных культур на диссоциацию, отсутствие бактериофага и дифференциацию по чувствительности бруцелл к анилиновым красителям (тест бактериостатического действия анилиновых красок).

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Пористая масса белого или белого с желтоватым оттенком цвета.

Восстановленный препарат – гомогенная мутная суспензия белого или белого с желтоватым оттенком цвета без посторонних примесей, осадка или хлопьев. Определение проводят визуально.

Подлинность. Должна содержать чистую культуру вакцинного штамма бруцеллезного микроба.

Определение проводят иммунофлуоресцентным методом с помощью иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих бруцеллезных, меченных ФИТЦ, в соответствии с инструкцией по применению. В мазках из вакцины должно наблюдаться специфическое ярко-зеленое свечение по периферии микробных клеток.

Время растворения. Должна полностью растворяться в течение 1 мин при добавлении 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида.

pH. От 6,8 до 7,2. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия». Для испытания используют 20 ампул, содержимое каждой ампулы растворяют в 1 мл воды для инъекций.

Время седиментационной устойчивости. Суспензия не должна расслаиваться в течение 5 мин. Определение проводят в соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

Проходимость через иглу. Гомогенная взвесь, диспергированная путем встряхивания, должна свободно проходить в шприц через иглу 0,8· 40, если нет иных указаний в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Суспензии».

Потеря в массе при высушивании. Не более 3,0 %. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Средняя масса и отклонение от средней массы. Коэффициент вариации массы вакцины в ампулах должен быть не более 5 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов. Вакцина не должна содержать посторонних микроорганизмов и грибов. В препарате должна содержаться живая чистая культура вакцинного штамма бруцелл. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методом пря-

мого посева на тиогликолевую среду.

За 1 образец принимают содержимое 2 ампул с препаратом. В ампулы вносят по 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, перемешивают и по 1 мл каждого образца высевают в пробирки, содержащие по 20 мл тиогликолевой среды. Одну пробирку из каждого образца инкубируют при температуре от 30 до 35 ^{o}С для выявления аэробных и анаэробных микроорганизмов, другую – при температуре от 20 до 25 ^{o}С для выявления грибов. Через 5 – 7 сут из каждой пробирки производят пересев по 0,5 мл в 2 пробирки, содержащие 10 мл тиогликолевой среды. Все пробирки выдерживают после пересева при соответствующих температурных режимах до 14 сут со дня первичного посева. Через 14 сут из всех пробирок делают мазки, окрашивают по Граму, просматривают под микроскопом при увеличении 90×10.

В случае обнаружения хотя бы в 1 из 10 просмотренных полей зрения кокков или грамположительных палочек препарат считается контаминированным посторонней микрофлорой.

При выявлении в мазках грамотрицательных палочек, отличающихся по морфологии от бруцелл, из этого образца готовят 3 мазка, которые исследуют в реакции иммунофлуоресценции, обрабатывая иммуноглобулинами диагностическими флуоресцирующими бруцеллезными сухими, и просматривают в каждом мазке не менее 10 полей зрения с помощью люминесцентного микроскопа. Если не все бактерии, обнаруживаемые в препарате, дают в ультрафиолетовом спектре специфическое ярко-зеленое свечение по периферии клеток (при использовании сывороток, меченых ФИТЦ), образец считают контаминированным посторонней микрофлорой. В этом случае контроль повторяют на удвоенном количестве образцов. В случае обнаружения посторонней микрофлоры при повторном посеве хотя бы в 1 пробирке вакцину считают не выдержавшей испытание.

Специфическая безопасность. Вакцина должна быть безопасной. Препарат, введенный подкожно белым мышам массой (19 ± 1) г в дозе $2 \cdot 10^{9}$ м.к., не должен вызывать их гибель в течение 6 сут наблюдения.

Вакцину разводят 0,9 % раствором натрия хлорида до концентрации $4 \cdot 10^9$ м.к. в 1 мл. Полученную микробную взвесь вводят подкожно 5 белым мышам массой (19 ± 1) г в объеме 0,5 мл во внутреннюю поверхность бедра.

Если погибла хотя бы 1 мышь, испытание повторяют на удвоенном количестве животных. Если при повторном контроле наблюдается гибель хотя бы 1 животного, вакцину считают не выдержавшей испытание.

Специфическая активность

1. ***Концентрация микробных клеток.*** В препарате должно содержаться $(7{,}0 \pm 3{,}0) \cdot 10^{10}$ бруцелл в 1 мл. Колебания результатов определений в отдельных ампулах серии не должны превышать 5 % от средней арифметической величины.

Количество м.к. определяют в 3 образцах. В ампулу с препаратом вносят по 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, перемешивают до получения равномерной суспензии. Вносят 0,1 мл разведенного испытуемого образца в пробирки и добавляют 0,9 % раствор натрия хлорида до достижения концентрации стандартного образца (СО) мутности, эквивалентной 10 МЕ.

Концентрацию м.к. (ОК) определяют по формуле:

$$\text{ОК} = (0{,}1 + n) \cdot 10 \cdot 1{,}7 \cdot 10^9,$$

где: 0,1 – объем растворенной вакцины, мл;

n– объем 0,9 % раствора натрия хлорида, взятый для разведения пробы, мл;

10 – постоянная величина;

$1{,}7 \cdot 10^9$ – концентрация м.к./мл для бруцелл по СО мутности, эквивалентная 10 МЕ.

2. ***Количество живых микробных клеток.*** Количество живых м.к. должно составлять не менее 60 % от общего количества микробных клеток в ампуле. Колебания результатов определений в отдельных ампулах серии не должны превышать 20 % от средней арифметической величины.

При определении содержания живых м.к. в вакцине используют конце-

вые химически чистые пипетки и бактериологические пробирки с 0,9% раствором натрия хлорида, которые должны быть охлаждены до температуры (4 ± 2) °С.

Испытание осуществляют одновременно с определением количества живых м.к. в стандартном образце вакцины бруцеллезной живой.

Для определения количества живых микробных клеток из приготовленных ранее образцов взвесей вакцины делают последовательные десятикратные разведения от 10^{-1} до 10^{-9}, используя для каждого разведения отдельную пипетку вместимостью 1 мл. Из разведений 10^{-8} и 10^{-9} высевают по 0,1 мл взвеси раздельно для каждого образца на 3 чашки Петри с эритрит-агаром или мясопептонным агаром.

После инкубации посевов в течение 5 сут при температуре (37 ± 1) °С подсчитывают количество выросших колоний, вычисляют среднее количество колоний для каждого разведения. К полученному числу добавляют количество нулей, равное показателю степени взятого разведения, суммируют и делят на количество посеянных разведений, т.е. на 2. Данное число увеличивают в 10 раз и получают количество живых бруцелл, содержащихся в 1 мл вакцины.

За количество живых м.к. принимают среднюю арифметическую определений количества живых клеток в 3 ампулах.

Процентное содержание живых микробных клеток вычисляют для каждой ампулы, принимая за 100 % число м.к., исходя из показателя концентрации для данной ампулы по формуле:

$$\text{Процентное содержание живых м.к.} = \frac{\text{БК}}{\text{ОК}} \cdot 100\ \%,$$

где: БК – количество живых м.к.в 1 мл;

ОК – общая концентрация м.к.

3. ***Количество накожных доз***. В ампуле должно содержаться от 4 до 10 накожных доз. Количество прививочных доз в ампуле устанавливается

путем деления среднего (по 3 ампулам) количества живых м.к./мл на 10^{10} м.к., составляющих 1 накожную прививочную дозу.

4. ***Иммуногенность***. Не менее 7 из 10 морских свинок, привитых подкожно дозой $2 \cdot 10^9$ живых бруцелл в 1 мл, должны быть предохранены от заражения 2 минимальными заражающими дозами вирулентного штамма *B. melitensis* 565. Одна минимальная заражающая доза *B. melitensis* 565 не должна превышать 10 м.к.

Иммунизируют подкожно дозой $2 \cdot 10^9$ живых м.к. в объеме 1 мл вакцины 10 морских свинок массой (350 ± 50) г любого пола. Через 28 – 30 сут иммунизированных и 3 неиммунизированных (контрольных) животных заражают подкожно путем введения 2 инфицирующих доз вирулентного штамма *B. melitensis* 565 в объеме 1 мл. Параллельно проверяют количество живых бруцеллезных бактерий в дозе для заражения, делая высев из разведения 10^{-7} по 0,1 мл на 3 чашки Петри с эритрит-агаром или мясопептонным агаром. Через 6 – 7 сут инкубации посевов при температуре (37 ± 1) ºС на каждой чашке Петри должно вырасти не менее 2 колоний.

Иммунизированных и контрольных морских свинок через 28 – 30 сут подвергают эвтаназии и вскрывают. Печень, селезенку, лимфоузлы (паховые, парааортальные, шейные) помещают в стерильную чашку Петри. Каждый орган надсекают ножницами, берут уколом стерильной деревянной палочкой и вносят в пробирку со скошенным печеночным агаром или агаром Альбими, тщательно втирая материал в поверхность агара. Затем посевной материал вносят в пробирки с эритрит-бульоном. Для посева каждого органа используют отдельную палочку.

Выросшие колонии бруцелл петлей высевают на среды с анилиновыми красками. Через 7 сут инкубации посевов при температуре (37 ± 1) ^{o}C выделенные культуры дифференцируют по редуцирующей способности бруцелл к анилиновым краскам и образованию сероводорода. *B. abortus* растет только на средах с фуксином, *B. melitensis* – в присутствии фуксина и тионина.

При выращивании культуры бруцелл только в бульоне ее пересевают на питательный агар и затем идентифицируют.

Не менее чем у 7 морских свинок, иммунизированных вакциной, при высевах из органов не должно быть роста *B. melitensis*. У всех контрольных (неиммунизированные) морских свинок должно быть обнаружено инфицирование, т.е. выделение *B. melitensis* из паренхиматозных органов (печень, селезенка) и лимфоузлов. В случае если вакцина защищает меньшее количество морских свинок, опыт повторяют по той же методике и на том же количестве животных в сравнении со стандартным образцом вакцины бруцеллезной живой. Если при повторном контроле стандартный образец предохраняет от заражения при введении 2 минимальных доз вирулентного штамма *B. melitensis* 565 не менее чем 7 из 10 иммунизированных свинок, а испытываемая – меньшее количество морских свинок, препарат считают не выдержавшим испытание.

Термостабильность. Не менее 7 сут. Показатель термостабильности (срок, в течение которого в препарате сохраняется 50 % живых микробных клеток по отношению к первоначальному количеству) определяют в 3 образцах после хранения вакцины при температуре (37 ± 1) °С в течение 14 сут.

Методика определения количества живых м.к. изложена в разделе «Специфическая активность».

Показатель термостабильности (t), выраженный в сут, рассчитывают по формуле:

$$t = \frac{0{,}3 \cdot 14}{\lg A_0 - \lg A_n},$$

где: $\lg A_0$ – логарифм первоначального количества живых м.к./мл;

$\lg A_n$ – логарифм количества живых м.к./мл через 14 сут хранения вакцины при температуре (37 ± 1) °С;

0,3 – постоянная величина;

14 – срок хранения вакцины при температуре (37 ± 1) °С, сут.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственны средств» и ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С.

Вакцина брюшнотифозная Ви-полисахаридная	ФС.3.3.1.0012.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину брюшнотифозную Ви-полисахаридную, представляющая собой раствор капсульного полисахарида, извлеченного из супернатанта культуры *Salmonella typhi*.

Вакцина брюшнотифозная Ви-полисахаридная предназначена для профилактики брюшного тифа.

ПРОИЗВОДСТВО

Технология производства вакцины брюшнотифозной Ви-полисахаридной предусматривает культивирование производственного штамма (штамма-продуцента) в жидкой синтетической питательной среде; получение биомассы и ее дезактивацию; выделение из полученной биомассы капсульного неочищенного Ви-полисахарида и его лиофилизацию; очистку Ви-полисахарида и лиофилизацию очищенного Ви-антигена; получение готовой формы препарата.

Производственный штамм *S. typhi* должен отвечать следующим требованиям:

– на плотной питательной среде образовывать круглые, гладкие, выпуклые, блестящие колонии (S-формы);

– на висмут-сульфитном агаре образовывать черные блестящие колонии;

– в мазках, окрашенных по Граму, должны присутствовать грамотрицательные палочки с закругленными концами;

– должен ферментировать глюкозу, маннит и мальтозу с образованием кислоты без газа;

– должен продуцировать сероводород;

– не должен ферментировать лактозу и сахарозу;

– не должен образовывать индол;

– LD_{50} производственного штамма должна быть не более 20 микробных клеток при внутрибрюшинном введении в 5 % муцине третьего типа белым беспородным мышам массой 16 – 20 г.

На этапе культивирования используют синтетическую питательную среду. Полученную биомассу контролируют на бактериологическую чистоту и типичность морфологии. Инактивацию проводят фенолом, по окончании процесса оценивают специфическую стерильность биомассы методом посева селективные питательные среды.

Полученную инактивированную культуральную жидкость центрифугируют, супернатант подвергают концентрированию и диализу. Концентрат Ви-антигена лиофилизируют, полученный после лиофилизации неочищенный Ви-полисахарид контролируют по массе и определяют Ви- и О-специфическую активность. Этап очистки предусматривает очистку от нуклеиновых кислот, балластных белков и диализ Ви-антигена.

Лиофильно высушенный препарат очищенного Ви-антигена представляет собой субстанцию для приготовления готовой формы препарата.

СУБСТАНЦИЯ ОЧИЩЕННОГО Ви-антигена

Описание. Белый аморфный порошок.

Подлинность. Оценивается в реакции преципитации в геле по Оухтерлони с монорецепторной Ви-сывороткой (подраздел «Подлинность» раздела «Испытания»). Линия преципитации 0,01 % раствора субстанции должна быть идентичной линии преципитации стандартного образца (СО).

Белок. Не более 1,0 %. Определение проводят по методу Лоури без предварительного осаждения белка в соответствии с ОФС «Определение

белка колориметрическим методом (метод Лоури) в биологических лекарственных препаратах». Субстанцию предварительно растворяют в воде очищенной до концентрации 5,0 мг/мл.

Нуклеиновые кислоты. Не более 2,0 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение нуклеиновых кислот по методу Спирина в биологических лекарственных препаратах». Субстанцию предварительно растворяют в воде очищенной до концентрации 1,0 мг/мл.

О-ацетильные группы. Не менее 2,0 мкмоль/мг. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение О-ацетильных групп в полисахаридных вакцинах». Субстанцию предварительно растворяют в воде очищенной до концентрации 1,0 мг/мл.

Молекулярные параметры. Не менее 50 % полисахарида должно элюироваться в объеме до коэффициента распределения K_d = 0,25. Определение проводят методом гель-фильтрации с использованием сефарозы. Через колонку длиной около 0,4 м, с внутренним диаметром 9 мм, уравновешенную 0,2 М раствором натрия хлорида пропускают около 0,9 мг полисахарида в объеме 0,5 мл и элюируют со скоростью около 14 мл/ч. Фракции регистрируют с помощью ультрафиолетового детектора при длине волны 206 нм. Выход полисахарида оценивают по площади пиков до и после K_d = 0,25.

Калибрование колонки. Определяют полный (V_t) и свободный (V_o) объемы колонки с помощью калибровочных растворов голубого декстрана и натрия азида в условиях, описанных выше.

Вычисляют объем выхода фракций в мл (V_e), соответствующий K_d = 0,25 по формуле:

$$V_e = V_0 + 0{,}25(V_t - V_0),$$

гдеV0 – свободный объем колонки (объем выхода голубого декстрана), мл;

Vt – общий объем колонки (объем выхода натрия азида), мл;

0,25 –коэффициент распределения вещества (Kd).

Рассчитывают значение объема выхода (V_e) в мм по формуле и находят на хроматограмме:

$$V_e = \frac{V_e(\text{мл}) \cdot V_t(\text{мм})}{V_t(\text{мл})}.$$

Пики, элюирующиеся до и после K_d = 0,25 (значение V_e на хроматограмме, мм), интегрируют вручную.

Содержание полисахарида (А) в процентах в субстанции вакцины, элюированного до Kd = 0,25, вычисляют по формуле:

$$A = \frac{S_1}{(S_1 + S_2)} \cdot 100\ \%,$$

где: S_1 – площадь пика, элюировавшегося до Kd = 0,25;

S_2 – суммарная площадь пиков, элюировавшихся до и после K_d = 0,25.

Определение молекулярных параметров можно проводить с помощью валидированного метода эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография» раздел «Эксклюзионная хроматография».

Примечания

1. Приготовление испытуемого раствора. Растворяют 0,9 ± 0,050 мг полисахарида в 0,5 мл 0,2 М раствора натрия хлорида. Полученный раствор перемешивают на шейкере в течение 2 мин. Раствор готовят непосредственно перед использованием.
2. Приготовление 0,1 % раствора натрия азида. Растворяют 1 мг натрия азида в 1мл 0,2М раствора натрия хлорида. Раствор перемешивают на шейкере в течение 1 мин. Раствор готовят непосредственно перед использованием.
3. Приготовление 0,5 % раствора голубого декстрана. Растворяют 0,5 мг голубого декстрана в 0,5 мл 0,2 М раствора натрия хлорида, перемешивают на шейкере в течение 1 мин, прибавляют 40 мкл 0,1 % раствора натрия азида и снова перемешивают на шейкере.

Растворы для калибрования хроматографической колонки готовят непосредственно перед использованием.

4. Приготовление 0,2 М раствора натрия хлорида. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 500 мл воды очищенной, прибавляют 11,7 г натрия хлорида, доводят объём раствора водой до метки. Раствор перемешивают на магнитной мешалке в течение 5 мин и хранят при температуре 4 – 8 °С в течение 1 мес.

Специфическая активность. Содержание Ви-антигена в субстанции должно быть от 70 до 130 %. Испытания проводят методом ракетного имму-

ноэлектрофореза (подраздел «Специфическая активность» раздела «Испытания»).

Пирогенность. Субстанция должна быть апирогенной. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Тест - доза 0,025 мкг/мл в 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида на 1,0 кг массы животного.

Аномальная токсичность. Субстанция должна быть нетоксичной. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

Готовят раствор субстанции в концентрации 100,0 мкг в 1,0 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Тест-доза для морских свинок – 1,0 мл испытуемого раствора подкожно, для мышей – 0,5 мл испытуемого раствора внутрибрюшинно.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Бесцветная прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость с запахом фенола. Определение проводят органолептически.

Подлинность. Подлинность препарата вакцины оценивают в реакции преципитации в геле по Оухтерлони. Вакцина брюшнотифозная полисахаридная должна давать дугу преципитации, идентичную СО Ви-антигена, с монорецепторной Ви-сывороткой (приготовление сыворотки указывают в нормативной документации).

Для постановки реакции пластиковую или стеклянную пластины размером 8,5 × 9,5 см заливают 12 мл 1 % геля агарозы, приготовленном на 0,9 % растворе натрия хлорида. В застывшем слое геля с помощью пробойника и специального трафарета делают лунки: одну центральную, остальные – на периферии. Диаметр лунок – 0,4 см, расстояние между ними должно быть 0,4 см. В центральную лунку вносят 15 мкл раствора монорецепторной Ви-сыворотки (титр не ниже 1:800), в периферические – по 15 мкл СО и испытуемой вакцины, а также 0,9 % раствор натрия хлорида в качестве отрицательного контроля. Затем пластину помещают во влажную камеру на 24 – 48 ч. Вакцину считают подлинной, если линия преципитации вакцины в отношении монорецепторной Ви-сыворотки идентична линии преципитации СО.

Прозрачность. Прозрачная или опалесцирующая жидкость не более эталона I. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Цветность. Бесцветная жидкость. Определение проводят визуально в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH. От 6,7 до 7,3. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Стерильность. Вакцина должна быть стерильна. Испытания проводят методом прямого посева в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность. Вакцина должна быть апирогенной. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Готовят разведение испытуемого образца с помощью апирогенного 0,9 % раствора натрия хлорида до конечной концентрации 0,025 мкг/мл. С этой целью к 0,1 мл испытуемого образца прибавляют 1,9 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и перемешивают, затем отбирают 0,1 мл разведенного образца и прибавляют 9,9 мл 0,9 % натрия хлорида. Вводят кроликам из расчета 1 мл испытуемого образца в концентрации 0,025 мкг/мл на 1 кг массы животного.

Аномальная токсичность. Вакцина должна быть нетоксичной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Тест-доза для морских свинок – 1,0 мл подкожно; для мышей – 0,5 мл внутрибрюшинно.

Специфическая активность. Одна доза вакцины должна содержать (25 ± 7,5) мкг Ви-антигена. Определение проводят методом ракетного иммуноэлектрофореза (РИЭФ).

В химическую пробирку с 16 мл расплавленного и охлажденного до температуры 56 °С 1 % геля агарозы вносят 0,5 мл сыворотки против Ви-антигена *S.typhi* (титр не ниже 1:800) и перемешивают. Содержимое пробирки выливают на стеклянную пластинку размером 6 × 12 см, установленную на горизонтальной поверхности. Пластинка должна покрыться гелем агарозы равномерно и полностью. Толщина геля должна составлять (1,0 ± 0,1) мм. После застывания геля агарозы пластинку накладывают на трафарет и пробивают лунки пробойником диаметром 4 мм, после чего удаляют гель из лунок с помощью вакуумного насоса или иглы.

В катодную и анодную части электрофоретической камеры заливают по 800 мл разведенного трис-боратного буферного раствора (раствор 2) и охлаждают заполненную буферным раствором камеру до температуре 4 °С в холодильной установке. Охлажденную камеру вынимают и помещают в нее пластину таким образом, чтобы край пластины с лунками находился у анодной части.

Электродные мостики для соединения гелевой пластины с буферным раствором готовят из 4 слоев фильтровальной бумаги размером 6 × 12 см. С их помощью соединяют поверхность агарозы с трис-боратным буферным раствором. Расстояние от края мостика до лунок должно быть не менее 15 мм. В лунки последовательно вносят по 15 мкл раствора СО Ви-антигена с концентрацией 5; 10; 15; 20 мкг/мл для построения калибровочного графика и испытуемый образец вакцины, предварительно разведенный в 5 раз. Проводят электрофорез при напряжении 180 –200 В при постоянной силе тока 10 мА в течение 4 ч. Каждую пробу вносят в 2 лунки. Время от начала нанесения образцов до включения прибора не должно превышать 10 мин. По окончании электрофореза пластинку переносят в кювету с 0,9 % раствором натрия хлорида и выдерживают 15 – 20 ч при температуре 18 – 20 °С для от-

мывания от сыворотки. После этого пластинку вынимают, накрывают фильтровальной бумагой, прокалывают бумагу иглой над лунками и сушат на воздухе при температуре 18 – 20 °С. После высушивания геля агарозы пластинку с гелем переносят в кювету с красителем на 20– 25 мин, а затем в кювету с раствором для обесцвечивания окрашенных гелей на 15–20 мин, далее пластинку промывают водой и сушат при температуре 18 – 20 °С.

По окончании процедуры измеряют высоту пика (h) от края лунки до максимальной внешней высоты пика (ракеты). Строят калибровочный график, откладывая по оси абсцисс концентрации Ви-антигена, а по оси ординат – высоту пика («ракеты») СО. По калибровочной кривой находят концентрацию Ви-антигена в испытуемом образце с учетом предварительного разведения. Содержание Ви-антигена (*X*) в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{\text{C} \cdot 100}{50},$$

где:С - концентрация Ви-антигена в испытуемом образце, найденная по калибровочному графику, с учетом предварительного разведения, мкг/мл;

50 - среднее номинальное значение содержания Ви-антигена в 1 мл анализируемой вакцины, мкг/мл.

Построение калибровочного графика. СО Ви-антигена разводят, исходя из аттестованного значения, до концентрации 20 мкг/мл в соответствии с инструкцией по применению. К 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 мл прибавляют воду очищенную до конечного объема 0,4 мл (концентрация Ви-антигена в полученных растворах 5; 10; 15; 20 мкг/мл соответственно). В пробирку, содержащую 0,4 мл раствора СО, воду очищенную не добавляют. Растворы используют свежеприготовленными.

Примечания

1. Приготовление испытуемого раствора. Испытуемый образец анализируемой вакцины разводят в 5 раз. Для этого к содержимому ампулы добавляют 2,0 мл трис-боратного буферного раствора с трилоном Б, pH 8,6 – 8,8 (раствор 3). Раствор хранят при температуре 2 – 8 °С в течение 6 мес.

2. Приготовление концентрированного трис-боратного буферного раствора с трилоном Б, pH 8,6 – 8,8 (раствор 1). В мерной колбе вместимостью

1000 мл последовательно растворяют в воде очищенной 60,5 г трис(гидроксиметил)аминометана, 6,0 г натрия эдетата (трилон Б), 19,0 г борной кислоты, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Раствор хранят при температуре 2 – 8 °С в течение 6 мес.

3. Приготовление электродного разведенного трис-боратного буферного раствора с трилоном Б, pH 8,6 – 8,8 (раствор 2). В мерную посуду вместимостью 2,0 л помещают 320 мл концентрированного трис-боратного буферного раствора, прибавляют 1280 мл воды очищенной и перемешивают. Раствор хранят при температуре 2 – 8 °С в течение 6 мес.

4. Приготовление разведенного трис-боратного буферного раствора с трилоном Б, pH 8,6 – 8,8 (раствор 3). В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 20,0 мл концентрированного трис-боратного буферного раствора (раствор 1), доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор хранят при температуре 2 – 8 °С в течение 6 мес.

5. Приготовление 1 % геля агарозы. В колбу вместимостью 250 мл помещают 2 г агарозыL и растворяют в 198 мл 0,5-кратного трис-боратного буферного раствора и перемешивают. Колбу помещают в кипящую водяную баню, прикрыв горлышко ватно-марлевой пробкой, и выдерживают при постоянном перемешивании до полного расплавления агарозы (раствор становится прозрачным, без пузырьков воздуха) в течение 1,5–2 ч. Разливают полученную смесь по 16 мл в стеклянные химические пробирки вместимостью 20 мл, пробирки выдерживают до полного застывания геля 1,0–1,5 ч при комнатной температуре. Укупоренные пробирки хранят при температуре 4 – 8 °С в течение 12 мес.

6. Приготовление красителя кумасси R. К 2 г кислотного синего 83 (кумасси бриллиантовый синий Р250), помещенного в колбу вместимостью 500 мл, прибавляют 180 мл 96 % этилового спирта, 180 мл воды очищенной, 40 мл уксусной кислоты ледяной и перемешивают. Раствор хранят в вытяжном шкафу при комнатной температуре в течение 12 мес.

7. Приготовление раствора для отмывки красителя. В колбу или градуированный стакан или цилиндр вместимостью 1 л помещают 450 мл 96 % этилового спирта, 100 мл уксусной кислоты ледяной, 450 мл воды очищенной и перемешивают. Раствор хранят в вытяжном шкафу при комнатной температуре в течение – 12 мес.

Фенол. Не более 0,75 мг/доза. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение фенола спектрофотометрическим методом в биологических лекарственных препаратах».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты». На вторичную упаковку наносится предупредительная надпись: «Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений».

Транспортирование. При температуре от 2 до 25 °С, допускается транспортирование при температуре 35 °С не более 14 сут.

Хранение. При температуре от 2 до 8 °С.

Вакцина дизентерийная против шигелл Зонне полисахаридная ФС.3.3.1.0013.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину дизентерийную против шигелл Зонне полисахаридную, представляющую собой раствор полисахарида, извлечённого из культуры *Shigella sonnei*, очищенного ферментативными и физико-химическими методами.

Вакцина применяется для профилактики дизентерии у взрослых и детей от 3 лет.

ПРОИЗВОДСТВО

Технология получения вакцины дизентерийной против шигелл Зонне полисахаридной предусматривает культивирование производственного штамма в жидкой синтетической питательной среде; получение биомассы и ее дезактивацию; выделение из полученной биомассы неочищенного полисахарида (ПС); лиофилизацию неочищенного ПС и его очистку, лиофилизацию очищенного ПС и получение готовой формы препарата с соблюдением установленных требований правил организации производства и контроля качества лекарственного препарата, гарантирующих качество и безопасность для человека.

Технология получения вакцины дизентерийной против шигелл Зонне полисахаридной предусматривает культивирование производственного штамма в жидкой синтетической питательной среде, выделение из получен-

ной биомассы неочищенного полисахарида, лиофилизацию неочищенного полисахарида, его очистку, лиофилизацию очищенного полисахарида.

Производственный штамм *S. sonnei* должен отвечать следующим требованиям: – на плотной питательной среде должен образовывать круглые выпуклые колонии с ровными краями (S-формы); в мазках, окрашенных по Граму, должны обнаруживаться грамотрицательные палочки; не должен ферментировать сорбит, дульцит, глюкозу и сахарозу; не должен образовывать индол; должен расщеплять ксилозу, арабинозу, рамнозу, лактозу; не должен образовывать сероводород; вирулентность штамма при внутрибрюшинном заражении белых беспородных мышей (LD_{50}) должна быть не выше 50 млн. микробных клеток; должен давать положительную кератоконъюнктивальную пробу на морских свинках.

На этапе культивирования используют синтетическую питательную среду. Полученную биомассу контролируют на бактериологическую чистоту и типичность морфологии. Инактивацию проводят формалином с массовой долей формальдегида не менее (37,0 ± 0,5) %, до конечной концентрации 0,5 %. Контроль инактивации проводят методом посева на мясопептонный агар (МПА) и среду Эндо.

Полученную инактивированную культуральную жидкость центрифугируют, раствор неочищенного ПС подвергают диализу. ПС лиофилизируют, в полученном препарате ПС исследуют О-специфическую активность.

Этап очистки ПС предусматривает очистку от нуклеиновых кислот, балластных белков и диализ. Лиофильно высушенный препарат очищенного ПС – субстанция для приготовления готовой формы препарата.

ИСПЫТАНИЯ НА СТАДИИ ПРОИЗВОДСТВА ПС - СУБСТАНЦИИ

Описание. Белый аморфный порошок.

Подлинность. 0,01 % раствор субстанции образует 1 линию преципитации с сывороткой кроличьей против ПС *S. sonnei*. Определение проводят в

реакции преципитации в геле по Оухтерлони с сывороткой кроличьей против ПС *S. sonnei* («Подлинность» в разделе «Испытания готового продукта»).

Белок. Не более 2,0 %. Испытания проводят по методу Бредфорда без предварительного осаждения белка в соответствии с ОФС «Определение белка». Субстанцию предварительно растворяют в воде очищенной до концентрации 5 мг/мл лиофилизата в объеме растворителя.

Нуклеиновые кислоты. Не более 2,0 %. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение нуклеиновых кислот по методу Спирина в биологических лекарственных препаратах». Субстанцию предварительно растворяют в воде очищенной до концентрации 1 мг/мл ПС в объеме растворителя.

Молекулярные параметры. Не менее 50 % ПС должно элюироваться в объеме до Kd = 0,5. Определение проводят методом гель-фильтрации («Молекулярные параметры» в разделе «Испытания готового продукта»).

Специфическая активность. 0,01 % раствор субстанции должен тормозить реакцию пассивной гемагглютинации с сывороткой диагностической к шигеллам Зонне неадсорбированной в концентрации не выше 6,25 мкг/мл; при отсутствии торможения с сывороткой диагностической к шигеллам Флекснера неадсорбированной в концентрации менее 25 мкг/мл («Специфическая активность» в разделе «Испытания готового продукта»).

Пирогенность. Субстанция должна быть апирогенной. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Тест-доза 0,050 мкг/мл в 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида на 1 кг массы животного.

Аномальная токсичность. Субстанция должна быть нетоксичной. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Готовят раствор субстанции в концентрации 100 мкг в 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Тест-доза для морских свинок – 1 мл испытуемого раствора подкожно, для мышей – 0,5 мл испытуемого раствора внутрибрюшинно.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Бесцветная прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость с запахом фенола. Определение проводят органолептически.

Подлинность. Вакцина должна образовывать 1 линию преципитации с сывороткой кроличьей против ПС *S. sonnei*. Приготовление сыворотки указывается в нормативной документации производителя. Определение проводят в реакции преципитации в геле по Оухтерлони.

Для постановки реакции пластиковую или стеклянную пластины размером 8,5 на 9,5 см заливают гелем агарозы по 12 мл на 1 пластину. В застывшем слое геля с помощью пробойника и специального трафарета делают лунки: одну центральную, остальные – на периферии. Диаметр лунок 0,4 см, расстояние между ними 0,4 см. В центральную лунку вносят по 15 мкл раствора сыворотки кроличьей против ПС *S. sonnei* (титр 1:800), в периферические – 15 мкл испытуемой вакцины. Затем пластину помещают во влажную камеру на 24 – 48 ч. Вакцину считают подлинной, если она дает 1 линию преципитации с сывороткой кроличьей против ПС *S. sonnei*.

Прозрачность. Прозрачная или опалесцирующая жидкость не более эталона 1. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Цветность. Бесцветная жидкость. Испытания проводят визуально в соответствии с ОФС « Степень окраски жидкостей».

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH. От 6,7 до 7,3. Испытания проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Молекулярные параметры. Не менее 50 % ПС должно элюироваться в объеме до коэффициента распределения Kd = 0,5. Определение проводят валидированным методом гель-фильтрации с использованием сефарозы. Че-

рез колонку длиной около 0,4 м с внутренним диаметром 9 мм, уравновешенную 0,2 М раствором натрия хлорида, пропускают около 0,9 мг ПС в объеме 0,5 мл раствора 0,2 М натрия хлорида и элюируют со скоростью около 14 мл/ч. Фракции регистрируют при помощи ультрафиолетового детектора при длине волны 206 нм. Выход ПС оценивают по площади пиков до и после Kd = 0,5.

Калибрование колонки. Определяют полный (V_t) и свободный (V_o) объемы колонки с помощью калибровочных растворов – голубого декстрана и натрия азида в условиях, описанных выше.

Вычисление объема колонки V_e, соответствующего Kd = 0,5, проводят по формуле:

$$V_e = V_o + 0{,}5\ (V_t - V_o),$$

где: V_o – свободный объем колонки (объем элюции голубого декстрана), мл;

V_t – общий объем колонки с гелем (объем элюции натрия азида), мл;

0,5 – значение коэффициента распределения вещества (Kd) на колонке.

Пересчитывают значение V_e в мм находят на хроматограмме и рассчитывают по формуле**:**

$$V_e(мм) = \frac{V_e(мл) \cdot V_t(мм)}{V_t(мл)}.$$

Пики, элюирующиеся до и после Kd = 0,5 (значение V_e на хроматограмме, мм), интегрируют вручную.

Содержание ПС (A) в субстанции вакцины, элюировавшегося до Kd = 0,5, выраженное в процентах, определяют по формуле:

$$A = \frac{S_1}{(S_1 + S_2)} \cdot 100\%,$$

где: S_1 – площадь пика, элюировавшегося до Kd = 0,5;

S_2 – суммарная площадь пиков, элюировавшихся до и после Kd = 0,5.

Примечания

1. Приготовление испытуемого раствора. Растворяют (0,9 ± 0,050) мг субстанции в 0,5 мл 0,2 М раствора натрия хлорида. Полученный раствор

перемешивают на шейкере в течение 2 мин. Раствор готовят непосредственно перед использованием.

2. Растворы для калибровки хроматографической колонки.

А. Приготовление 0,1% раствора натрия азида. Растворяют 1 мг натрия азида в 1 мл 0,2 М раствора натрия хлорида и перемешивают на шейкере в течение 1 мин. Раствор готовят непосредственно перед использованием.

Б. Приготовление 0,1 % раствора голубого декстрана. Растворяют 0,5 мг голубого декстрана в 0,5 мл 0,2 М раствора натрия хлорида. Полученный раствор перемешивают на шейкере в течение 1 мин. Добавляют в полученный раствор голубого декстрана 40 мкл 0,1 % раствора натрия азида и быстро перемешивают на шейкере. Раствор готовят непосредственно перед использованием.

В. Приготовление 0,2 М раствора натрия хлорида. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 500 мл воды очищенной, прибавляют 11,7 г натрия хлорида, доводят до метки водой очищенной и перемешивают на магнитной мешалке в течение 5 мин. Раствор хранят при температуре 4 – 8 °С в течение 1 мес.

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Стерильность. Должна быть стерильной. Испытания проводят методом прямого посева в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность. Должна быть апирогенной. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Вакцину разводят апирогенным 0,9 % раствором натрия хлорида так, чтобы 1 мл раствора содержал по 0,050 мкг ПС и вводят кроликам из расчета 1 мл раствора вакцины (0,050 мкг) на 1 кг массы животного.

Аномальная токсичность. Должна быть нетоксичной. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Морским свинкам вводят подкожно тест-дозу вакцины в объеме 1 мл, мышам – внутрибрюшинно тест-дозу 0,5 мл. Наблюдение за животными осуществляется ежедневно в течение 7 сут.

Специфическая активность. Вакцина должна тормозить реакцию пассивной гемагглютинации (РТПГА) с сывороткой диагностической к шигеллам Зонне неадсорбированной в концентрации не более 6,25 мкг/мл при

отсутствии торможения с сывороткой диагностической к шигеллам Флекснера неадсорбированной в концентрации менее 25 мкг/мл. Оценивается в реакции торможения пассивной гемагглютинации (РТПГА).

Ингредиенты для проведения РТПГА: сыворотки диагностические к шигеллам Зонне и Флекснера неадсорбированные, диагностикум эритроцитарный шигеллезный Зонне и Флекснера антигенный, испытуемая серия вакцины Шигеллвак, стандартный образец (СО) содержания ПС.

Определение рабочего разведения шигеллезных диагностических сывороток. Рабочее разведение определяют в реакции пассивной гемагглютинации. Для постановки реакции готовят двукратные разведения сывороток в 0,9 % растворе натрия хлорида в объеме 100 мкл, начиная с разведения сывороток 1:10, в полистироловых круглодонных планшетах. В каждую из лунок прибавляют по 25 мкл соответствующего диагностикума. Планшеты встряхивают и оставляют на 1,5 – 2 ч при комнатной температуре.

Контролями являются:

1) проверка отсутствия спонтанной агглютинации диагностикума. В 2 лунки, содержащие по 50 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида, прибавляют по 25 мкл диагностикума;

2) проверка на отсутствие в испытуемой сыворотке агглютининов к эритроцитам барана. В 2 лунки планшета вносят по 50 мкл сыворотки в разведении 1:10 и прибавляют по 25 мкл 1 % взвеси несенсибилизированных формалинизированных эритроцитов барана (контрольные эритроциты).

Учет реакции производится по «четырехкрестовой» системе. Титром антител испытуемой сыворотки считается последнее разведение сыворотки, при котором наблюдается агглютинация эритроцитов интенсивностью не менее чем на 3+ (+++), когда агглютинированы почти все эритроциты, и на их фоне определяется малозаметное кольцо из осевших неагглютинированных эритроцитов («зонтик»).

Рабочее разведение сыворотки для последующего использования в РТПГА берут на 4 разведения концентрированнее, чем исследуемый титр.

Для постановки РТПГА готовят двукратные разведения СО полисахарида и серии вакцины в 0,9 % растворе натрия хлорида в объеме 50 мкл, начиная с 100 мкг/мл ПС, в полистироловых планшетах. В каждую из лунок вносят 25 мкл сыворотки в рабочем разведении и прибавляют по 25 мкл диагностикума. Планшеты встряхивают и оставляют на 1,5 – 2 ч при комнатной температуре.

Учет результатов. Минимальная концентрация ПС, тормозящая гемагглютинацию (положительная РТПГА), должна быть не более 6,25 мкг/мл (наблюдается ярко выраженный осадок неагглютинированных эритроцитов).

Для неспецифических систем (при использовании сыворотки диагностической к шигеллам Флекснера) наблюдается отсутствие торможения в концентрации менее 25 мкг/мл.

Если полученные результаты не удовлетворяют этим условиям, или вакцина обладает неспецифической активностью, контроль повторяют. Если и при повторном контроле обнаруживают те же результаты, серию вакцины бракуют.

Фенол. Не более 0,75 мг/доза. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение фенола спектрофотометрическим методом в биологических лекарственных препаратах».

Упаковка и маркировка. Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственны средств» и ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование. При температуре от 2 до 25 °С, допускается транспортирование при температуре 35 °С не более 14 сут.

Хранение. При температуре от 2 до 8°С.

Вакцина лептоспирозная концентрированная инактивированная жидкая, суспензия для подкожного введения — ФС.3.3.1.0014.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину лептоспирозную концентрированную инактивированную жидкую, суспензию для подкожного введения, представляющую собой смесь инактивированных формальдегидом концентрированных культур лептоспир 4 серогрупп (*Leptospira interrogans Icterohaemorrhagiae copenhageni, L. interrogans Grippotyphosa grippotyphosa, L. interrogans Pomona mozdoc, L. interrogans Sejroe sejroe*).

В состав препарата входит консервант.

Вакцина предназначена для профилактики лептоспироза и вызывает развитие специфического иммунитета продолжительностью до 1 года.

ПРОИЗВОДСТВО

Все этапы производства вакцины должны гарантировать соблюдение установленных надлежащих правил, а также качество лекарственного препарата, гарантирующее его безопасность для человека.

Технология производства вакцины лептоспирозной концентрированной инактивированной жидкой предусматривает приготовление питательной среды Терских с кроличьей сывороткой, приготовление полусинтетической среды с альбумином сыворотки крови человека; высев на питательную среду и накопление концентрированной микробной массы штаммов 4 серогрупп лептоспир; сведение стандартизованной микробной массы в вакцину; розлив и

упаковку препарата. Производственные штаммы лептоспир должны расти на питательной среде Терских с кроличьей сывороткой и полусинтетической питательной среде с альбумином сыворотки крови человека; быть подвижными; обладать типичными культуральными, морфологическими и антигенными свойствами; быть специфичными в реакции микроагглютинации (РМА) с иммунной сывороткой и иммуногенными для золотистых хомячков.

На стадиях производства вакцины проводят определение роста лептоспир, чистоты культуры, подвижности лептоспир, концентрации микробной массы, подлинности, стерильности, специфической стерильности, безвредности, токсичности, специфической активности и содержания формалина.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Бесцветная слегка опалесцирующая жидкость с осадком, легко разбивающимся при встряхивании.

Подлинность. Вакцина должна вызывать у золотистых хомячков образование специфических антител, выявляемых в РМА со штаммами лептоспир 4 серогрупп (*L. interrogans Icterohaemorrhagiae copenhageni, L. interrogans Grippotyphosa grippotyphosa, L. interrogans Pomona mozdoc, L. interrogans Sejroe sejroe*) в титре не менее чем 1:100. Методика проведения испытания по разделу «Специфическая активность».

Прозрачность. Показатель оптической плотности препарата должен быть не менее 0,03. Определение проводят фотометрическим методом. Испытуемый образец тщательно перемешивают, помещают в кювету с толщиной слоя 3 мм и измеряют оптическую плотность при длине волны 315 нм по сравнению с водой очищенной.

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH. От 7,2 до 7,6. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия». Для испытания используют со-

держимое 5 образцов.

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Время седиментационной устойчивости. Суспензия не должна расслаиваться в течение 5 мин. Определение проводят в соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

Проходимость через иглу. Гомогенная взвесь, диспергированная путем встряхивания, должна свободно проходить в шприц через иглу 0,8· 40, если нет иных указаний в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Суспензии».

Формальдегид. Не более 0,3 мг/мл. Определение проводят колориметрическим методом в соответствии с ОФС «Количественное определение формальдегида в биологических лекарственных препаратах».

Стерильность. Должна быть стерильной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методом прямого посева.

Специфическая стерильность. Не должна содержать живых лептоспир. Определение проводят путем высева по 0,2 мл вакцины в 3 бактериологические пробирки с 7 мл фосфатно-сывороточной среды Терских.

Состав среды Терских (на 1 л):

- натрий фосфорнокислый двузамещенный – 0,85 г;
- калий фосфорнокислый однозамещенный – 0,25 г;
- вода очищенная – 950 мл;
- сыворотка крови кролика нормальная инактивированная – 50 мл.

Пробирки с посевами инкубируют при температуре (28 ± 1) ºС в течение 20 сут. Затем делают из выделенных культур мазки по методике, указанной в разделе «Специфическая безопасность».

Просматривают не менее 30 полей зрения в темном поле микроскопа при увеличении 200×. В посевах не должны обнаруживаться живые (подвиж-

ные) лептоспиры. При обнаружении живых лептоспир хотя бы в 1 посеве препарат считают не выдержавшим испытание.

Аномальная токсичность. Должна быть нетоксичной. Вакцину вводят животным по 0,5 мл: белым мышам внутрибрюшинно, морским свинкам – подкожно. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

Специфическая безопасность. Должна быть безопасной, не содержать живых лептоспир.

Для проведения испытания используют золотистых хомячков массой (22 ± 3) г. Трем животным однократно внутрибрюшинно вводят по 0,5 мл вакцины. Наблюдение за животными ведут в течение 20 сут. К концу срока хомячков обескровливают декапитацией. Кровь используют для получения иммунной сыворотки и исследования ее в РМА при определении специфической активности вакцины. После обескровливания животных проводят их вскрытие и затем пастеровской пипеткой делают посев коркового слоя почек в бактериологические пробирки со средой Терских.

Вскрытие животных и забор материала для посева проводят при строгом соблюдении правил асептики. Посевы инкубируют в течение 7 сут в термостате при температуре (28 ± 1) ºС. Затем отбирают 0,02 мл микробной взвеси и просматривают не менее 30 полей зрения в темном поле микроскопа при увеличении 200×. При обнаружении роста лептоспир хотя бы в 1 посеве вакцину считают не выдержавшей испытание.

Специфическая активность. Препарат должен обладать специфической иммуногенной активностью − вызывать у золотистых хомячков образование специфических антител, выявляемых в РМА со штаммами лептоспир 4 серогрупп в титре не менее, чем 1:100; защищать не менее 3 из 4 животных от заражения вирулентной культурой *L. interrogans Icterohaemorrhagiae copenhageni*. Трем золотистым хомячкам массой (22 ± 3) г однократно внутрибрюшинно вводят по 0,5 мл вакцины. Через 20 сут после иммунизации животных обескровливают декапитацией. Кровь собирают во флаконы (пробир-

ки) и инкубируют в термостате в течение 30 – 40 мин при температуре (37 ± 1) °С, затем выдерживают в холодильнике при температуре (6 ± 2) °С в течение 24 – 48 ч. Полученную иммунную сыворотку отбирают в стерильные пробирки и исследуют в РМА для выявления специфических антител к штаммам лептоспир 4 серогрупп, входящих в состав вакцины.

Методика реакции микроагглютинации (РМА)

РМА ставят в лунках полистиролового планшета. В лунки с А1 по А4 вносят по 0,2 мл анализируемой сыворотки, разведенной 1:25 0,9 % раствором натрия хлорида. В лунки с В1 – В4 по F1 – F4 вносят по 0,1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Разведение сыворотки осуществляют автоматической пипеткой в направлении лунок от А к F (в вертикальном ряду), перенося по 0,1 мл каждого разведения в следующую в ряду лунку, получая таким образом разведения сыворотки с 1:25 до 1:800.

В качестве антигенов используют 7 – 12-суточные культуры лептоспир 4 серогрупп (*L. interrogans Icterohaemorrhagiae copenhageni, L. interrogans Grippotyphosa grippotyphosa, L. interrogans Pomona mozdoc, L. interrogans Sejroe sejroe*), выращенные на среде Терских. При нанесении 0,02 мл культуры каждой серогруппы на предметное стекло количество лептоспир должно быть не менее 100 – 150 клеток в поле зрения микроскопа при увеличении 200×.

После разведения сыворотки в каждый ряд лунок от А1 до F1, от А2 до F2, от А3 до F3 и от А4 до F4 вносят по 0,1 мл культуры лептоспир соответствующей серогруппы. После добавления антигенов получают разведение сывороток от 1:50 до 1:1600 в каждом вертикальном ряду. Одновременно проводят контроль культур: в 4 лунки (Н1, Н2, Н3, Н4) вносят по 0,1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и по 0,1 мл живой культуры лептоспир каждой серогруппы в отдельности. Планшет выдерживают в течение 1 ч при температуре (37 ± 1) °С. Из лунок планшета с определенной серогруппой отбирают по 0,02 мл смеси сыворотки и культуры лептоспир, наносят на предметное

стекло, накрывают покровным стеклом и микроскопируют в темном поле зрения при увеличении 200×.

Результаты реакции оценивают по условной «трехкрестовой системе»:

+ — 1/3 лептоспир агглютинированы;

++ — от 1/3 до 2/3 лептоспир агглютинированы;

+++ — более 2/3 или все лептоспиры агглютинированы;

контроль — агглютинация отсутствует, все клетки лептоспир находятся в свободном состоянии и полностью подвижны.

Положительной РМА с живыми культурами лептоспир 4 серогрупп считается реакция не менее чем на «+».

Тест активной защиты. Четырем золотистым хомячкам массой (22 ± 3) г однократно внутрибрюшинно вводят по 0,5 мл вакцины. Через 20 сут 4 иммуннизированных и 4 неиммуннизированных (контрольных) животных заражают внутрибрюшинно вирулентной культурой *L. interrogans Icterohaemorrhagiae copenhageni* с содержанием 100 – 150 лептоспир в поле зрения микроскопа (200×) в объеме 1 мл. Наблюдение за животными ведут в течение 7 сут.

В контрольной группе не менее 3 животных должны заболеть или погибнуть, 3 из 4 иммуннизированных и зараженных животных не должны заболеть или погибнуть. Если выживают и гибнут менее 3 иммуннизированных и зараженных животных соответственно, испытание повторяют. При получении аналогичных результатов вакцину считают не выдержавшей испытание.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С.

Вакцина менингококковая серогруппы А полисахаридная сухая	ФС.3.3.1.0015.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину менингококковую серогруппы А полисахаридную сухую, представляющую собой лиофилизат очищенного капсульного полисахарида *Neisseria meningitidis* серогруппы А.

Полисахарид *Neisseria meningitidis* серогруппы А состоит из частично О-ацетилированных повторяющихся фрагментов N-ацетилманнозамина, связанных 1α-6 фосфодиэфирными связями.

Вакцинаа менингококковая серогруппы А полисахаридная сухая предназначена для профилактика заболеваний, вызываемых менингококками серогруппы А.

ПРОИЗВОДСТВО

Технология получения вакцины менингококковой полисахаридной серогруппы А предусматривает культивирование штамма-продуцента в жидкой питательной среде Франца с последующим выделением из полученной биомассы полисахарида менингококка серогруппы А и его очисткой.

Процесс культивирования производственного штамма *N. meningitidis* должен осуществляться на плотных питательных средах, не содержащих элементов крови и других субстратов животного происхождения. Весь производственный процесс, основанный на использовании системы посевного материала и обеспечивающий стабильное получение вакцины для профилак-

тики менингококковой инфекции серогруппы А с требуемой иммуногенностью и безопасностью для человека, должен быть валидирован.

Посевной материал. Штамм-продуцент *N. meningitidis* должен быть охарактеризован по источнику его выделения и способности продуцировать полисахарид серогруппы А. Производственный штамм *N. meningitidis* серогруппы А должен обладать следующими свойствами:

- на питательном агаре с добавлением 20 % сыворотки крови крупного рогатого скота должен образовывать круглые, гладкие, прозрачные, бесцветные блестящие колонии с ровными краями, слегка выпуклые, мягкие по консистенции, которые легко снимаются с поверхности среды. Диаметр колоний должен быть от 0,5 до 2 мм. В косопроходящем свете колонии должны иметь ярко-оранжевую окраску с радужным свечением;

- в мазках, окрашенных по Граму, должны присутствовать грамотрицательные диплококки, расположенные парами в виде «кофейных зерен», а также тетрадами или скоплениями;

- культура тест-штамма должна быть оксидазоположительна;

- культура тест-штамма должна разлагать глюкозу и мальтозу с образованием уксусной кислоты и не должна разлагать лактозу, сахарозу и фруктозу;

- суспензия культуры тест-штамма должна вступать в реакцию агглютинации только со специфической сывороткой серогруппы А и не агглютинироваться сыворотками против других серогрупп менингококков, а также не давать спонтанную реакцию агглютинации в 0,9 % растворе натрия хлорида.

Бактериологическая чистота штамма-продуцента должна быть подтверждена посевом на чувствительные питательные среды, исследованием морфологии колоний, микроскопией мазков, окрашенных по Граму, а также постановкой реакции агглютинации со специфической и неспецифическими сыворотками.

На этапе культивирования производственного штамма с целью получения конечного объема биомассы используют жидкую полусинтетическую

среду, не содержащую субстанций, которые могут осаждаться цетилтриметиламмония бромидом, а также не содержащую элементов крови или высокомолекулярных полисахаридов.

Бактериологическая чистота полученной биомассы должна оцениваться и подтверждаться методами, применяемыми для оценки чистоты штамма-продуцента.

Бактериальный сбор центрифугируют и осаждают полисахарид из надосадочной жидкости добавлением цетилтриметиламмония бромида до его конечной концентрации 0,01 %, после чего следует экстракция полисахарида из цетавлон-полисахаридного комплекса раствором кальция хлорида. Полученный полисахарид хранят при температуре минус 20 °С.

Субстанцией полисахаридной менингококковой вакцины серогруппы А является полисахарид, очищенный от нуклеиновых кислот, белка и липополисахарида путем ступенчатого фракционирования этанолом и экстракцией фенолом. Очищенную субстанцию сушат в эксикаторе до постоянной массы над прокаленным кальция хлоридом и хранят при температуре минус 20 °С.

На стадии производства субстанцию испытывают по следующим показателям:

Подлинность. Субстанция должна тормозить реакцию пассивной гемагглютинации (положительная РТПГА) в гомологичной «А» системе в концентрации, не превышающей 0,4 мкг полисахарида в 1 мл, при отсутствии тормозящего эффекта в гетерологичной «С» системе с содержанием полисахарида 50 мкг/мл (см. подраздел «Подлинность» раздела «Испытания»).

Белок. Не более 1 %. Определение проводят по методу Лоури без предварительного осаждения белка в соответствии с ОФС «Определение белка колориметрическим методом (метод Лоури) в биологических лекарственных препаратах». Субстанцию предварительно растворяют в воде очищенной до концентрации 5 мг/мл.

Нуклеиновые кислоты. Не более 1 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение нуклеиновых кислот по методу Спирина в

биологических лекарственных препаратах». Субстанцию предварительно растворяют в воде очищенной до концентрации 5,0 мг/мл.

О-ацетильные группы. Не менее 2 мкмоль/мг. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение О-ацетильных групп». Субстанцию предварительно растворяют в воде очищенной до концентрации 1 мг/мл.

Фосфор. Не менее 8 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрическое определение фосфора в биологических лекарственных препаратах».

Молекулярные параметры. Не менее 65 % полисахарида, элюируемого до достижения значения коэффициента распределения Kd, равного 0,50 (подраздел «Молекулярные параметры» раздела «Испытания»).

Пирогенность. Субстанция должна быть апирогенной. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Тест-дозу 0,025 мкг/мл вводят по 1 мл на 1 кг массы животного.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Аморфная масса в форме таблетки или рыхлого порошка от белого до беловато-серого цвета.

Восстановленный препарат - бесцветный или желтоватого цвета раствор. Определение проводят визуально.

Подлинность. Вакцина должна вызывать торможение реакции пассивной гемагглютинации (положительная РТПГА) в гомологичной «А» системе, не превышающей 0,4 мкг полисахарида в 1 мл, при отсутствии тормозящего эффекта в гетерологичной «С» системе с содержанием полисахарида 50 мкг в 1 мл.

Ингредиенты для проведения реакции торможения пассивной гемагглютинации (РТПГА):

- исследуемый раствор вакцины, содержащий 50 мкг полисахарида серогруппы А в 1 мл;

- менингококковые сыворотки серогрупп А и С, и диагностикумы менингококковые эритроцитарные серогрупп А и С;

- 0,9 % раствор натрия хлорида.

Определение рабочего разведения менингококковых диагностических сывороток. Для приготовления рабочего разведения менингококковых диагностических сывороток определяют их специфический титр в РТПГА с диагностикумами эритроцитарными менингококковыми серогрупп А и С. Для постановки РТПГА используют круглодонный планшет для иммунологических реакций однократного применения. В 2 ряда лунок, начиная со второй, вносят по 50 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида. В первые лунки вносят по 100 мкл менингококковых сывороток серогрупп А и С, разведенных 1:10 с помощью 0,9 % раствора натрия хлорида. Далее готовят двукратные последовательные разведения каждой сыворотки, перенося из лунки в лунку по 50 мкл сыворотки. Из последней лунки 50 мкл разведения сыворотки удаляют. Затем в каждую лунку прибавляют по 25 мкл эритроцитарного диагностикума, гомологичного сыворотке. В 4 лунки (контроль отсутствия спонтанной агглютинации диагностикума) вносят по 50 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида. В 2 лунки добавляют по 25 мкл диагностикума серогруппы А, а в 2 другие – по 25 мкл диагностикума серогруппы С. После перемешивания ингредиентов путем покачивания планшет помещают в термостат при температуре от 36 до 38 °С на 2 – 2,5 ч, после чего проводят учет результатов. Последнее разведение сывороток, в котором наблюдается агглютинация почти всех эритроцитов с малозаметным кольцом из осевших неагглютинированных эритроцитов, является титром сыворотки и содержит 1 гемагглютинирующую единицу (ГАЕ). Предыдущее разведение содержит 2 ГАЕ и используется в качестве рабочего разведения сыворотки.

В контрольных лунках агглютинация должна полностью отсутствовать, а эритроциты выпадать на дно лунки в виде полусфер.

Проведение РТПГА. В первые лунки 2 рядов планшета для иммунологических реакций вносят по 50 мкл испытуемого раствора вакцины менин-

гококковой серогруппы А в исходной концентрации 50 мкг в 1 мл. В остальные лунки вносят по 25 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида. Затем исходные растворы вакцины титруют путем двукратных разведений в объеме 25 мкл до 12-й лунки включительно; из последней лунки 25 мкл удаляют. В каждую лунку первого ряда добавляют по 25 мкл рабочего разведения гомологичной сыворотки. В каждую лунку второго ряда добавляют по 25 мкл гетерологичной сыворотки. После 15 – 20 мин экспозиции при температуре от 18 до 22 °С в каждую лунку добавляют по 25 мкл эритроцитарного диагностикума, гомологичного добавленной сыворотке. Таким образом, в 1 ряду реагирующая смесь будет состоять из гомологичных вакцине сыворотки и эритроцитов, во втором ряду – из вакцины и гетерологичных ей сыворотки и эритроцитов. Реакцию учитывают после 1,5 – 2 ч инкубирования в термостате при температуре от 36 до 38 °С. После окончания инкубации отмечают минимальную концентрацию вакцины, которая подавляет агглютинацию эритроцитов. Специфичность вакцины подтверждается, если задержка гемагглютинации наблюдается только в гомологичной системе.

Контролем являются отсутствие спонтанной агглютинации и проверка правильности выбранного рабочего разведения сыворотки.

Время растворения. Содержимое ампулы должно полностью раствориться в 2,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида в течение 1 мин при встряхивании.

Прозрачность восстановленного раствора. Восстановленная вакцина должна выдерживать сравнение с эталоном I. Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей». Содержимое 4 ампул растворяют в 10 мл 0,9 % раствора натрия хлорида.

Цветность восстановленного раствора. Восстановленная вакцина должна выдерживать сравнение с эталоном Y_4. Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей». Содержимое 4 ампул растворяют в 10 мл 0,9 % раствора натрия хлорида.

Механические включения. Восстановленная вакцина должна соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

Потеря в массе при высушивании. Не более 2,5 %. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Точность розлива. Не более 10 %. Определение проводят весовым методом. 20 ампул без этикеток обрабатывают смесью спирта с эфиром и помещают в эксикатор на 3 ч. Затем верхнюю часть каждой ампулы надпиливают и удаляют. Вскрытые ампулы с веществом взвешивают на аналитических весах, после чего содержимое удаляют, ампулы промывают водой, ополаскивают водой очищенной. После этого ампулы выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100 – 105 °С до постоянной массы. По разности масс ампулы с содержимым и без него рассчитывают коэффициент вариации (*V*) в процентах по формулам:

$$V = \frac{S \cdot 100}{\bar{x}},$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum(X-\bar{x})^2}{n-1}},$$

где: S – стандартное отклонение;

$\bar{x}$ – среднее арифметическое значение массы вещества в ампуле;

X – масса вещества в каждой ампуле;

n – число ампул.

Фосфор. Содержание фосфора в вакцине должно быть не менее 7,5 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрическое определение фосфора в биологических лекарственных препаратах».

Молекулярные параметры. Не менее 65 % полисахарида, элюируемого до достижения значения коэффициента распределения Kd = 0,50. Определение молекулярных параметров проводят методом эксклюзионной хроматографии в соответствии с методикой, изложенной в нормативной докумен-

тации, где должны быть указаны: размер хроматографической колонки, характеристика носителя и способ его приготовления, методика приготовления элюирующего раствора, количество и способ введения испытуемого и стандартных образцов, скорость элюирования подвижной фазы, условия калибрования колонки, объем элюируемых фракций, процедура сбора фракций.

Содержание полисахарида. Вакцина должна содержать не менее 70 % и не более 130 % полисахарида, входящего в состав препарата. Содержание полисахарида рассчитывают путем пересчета содержания фосфора на полисахарид или иммунохимическим методом, описанным в нормативной документации.

Стерильность. Вакцина должна быть стерильна. Определение проводят методом прямого посева в соответствии с ОФС «Стерильность».

Аномальная токсичность. Вакцина должна быть нетоксичной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Тест-доза для 5 белых мышей – по 100 мкг полисахарида внутрибрюшинно, тест-доза для 2 морских свинок – по 500 мкг полисахарида внутрибрюшинно. Период наблюдения за животными составляет 7 сут.

Пирогенность. Вакцина должна быть апирогенной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Тест-доза 0,025 мкг/мл полисахарида вводится по 1 мл на 1 кг массы животного.

Содержание лактозы. Должно быть в пределах (10 ± 1) мг в пересчете на ампулу. Определение проводят в соответствии с ОФС «Рефрактометрия». В 3 ампулы с вакциной добавляют по 1 мл воды очищенной. Содержимое ампул объединяют. На призму рефрактометра наносят 1 каплю раствора испытуемого образца и определяют показатель преломления. По калибровочному графику находят концентрацию лактозы. Содержание лактозы в 1 ампуле вычисляют как среднее арифметическое 3 измерений.

Построение калибровочного графика. В 10 стеклянных пробирок вносят пипеткой по 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 и 1 мл основного раствора лактозы, доводят объем водой очищенной до 1 мл и перемешивают

(содержание лактозы соответственно: 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5; 20; 22,5 и 25 мг/мл). Измеряют показатель преломления каждого раствора и строят калибровочный график, откладывая по оси абсцисс количество лактозы в мг/мл, а по оси ординат – показатель преломления. Калибровочный график воспроизводят при каждом анализе.

Примечание

Приготовление 2,5 % основного раствора лактозы. В мерной колбе вместимостью 100 мл растворяют в воде очищенной 2,5 г лактозы моногидрата при нагревании на водяной бане при температуре не выше 60 °С. Объем раствора доводят водой до метки и перемешивают. Перед использованием охлаждают до комнатной температуры. Основной раствор используют свежеприготовленным.

Упаковка и маркировка. Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственны средств» и ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С в соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Вакцина сибиреязвенная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и накожного скарификационного нанесения ФС.3.3.1.0016.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину сибиреязвенную живую, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и накожного скарификационного нанесения, представляющую собой лиофилизированную в стабилизирующей среде взвесь живых спор вакцинного штамма *Bacillus anthracis* СТИ-1.

Вакцина предназначена для профилактики сибирской язвы и обеспечивает развитие специфического иммунитета продолжительностью до 1 года.

ПРОИЗВОДСТВО

Вакцинный штамм *B. anthracis* СТИ-1 должен иметь типичные культуральные, морфологические, биохимические и генетические свойства; должен обладать остаточной вирулентностью для морских свинок (при введении 50 млн спор) и белых мышей (10 млн спор), должен вызывать гибель 50 – 70 % животных; быть специфически безопасным для кроликов при введении им 250 млн спор; индекс иммунитета для морских свинок должен быть не ниже 10000.

Перед приготовлением очередной серии вакцинного штамма проводят его анимализацию путем пассажа через организм морской свинки с последующим отбором типичных колоний, выросших на плотной питательной среде при посеве селезенки.

Технология производства вакцины сибиреязвенной живой состоит из получения посевной культуры штамма *B. anthracis* СТИ-1; глубинного культивирования штамма *B. anthracis* СТИ-1 для получения нативной споровой культуры; приготовления концентрированной споровой взвеси с последующим розливом, замораживанием, сублимационным высушиванием, герметизацией и упаковкой препарата. В качестве вспомогательного вещества используют сахарозу, разрешенную для использования при производстве иммунобиологических лекарственных препаратов.

На стадиях приготовления посевной и нативных культур контролируют pH, концентрацию спор, спорообразование, отсутствие посторонней микрофлоры.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Пористая масса серовато-белого или желтовато-белого цвета с коричневатым оттенком.

Восстановленный препарат – непрозрачная гомогенная суспензия серовато-белого или желтовато-белого цвета без посторонних включений. Определение проводят визуально.

Подлинность. Должна содержать чистую культуру вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1. Определение проводят при микроскопии мазков, окрашенных по Цилю-Нильсену. В мазках из препарата должны наблюдаться овальные споры розового цвета с красным ободком по периферии.

Время растворения. Должна полностью растворяться в течение 5 мин в 1 мл воды очищенной или в 1 мл 30 % водного раствора глицерола при встряхивании.

Время седиментационной устойчивости. Суспензия не должна расслаиваться в течение 5 мин. Определение проводят в соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

Проходимость через иглу. Гомогенная взвесь, диспергированная путем встряхивания, должна свободно проходить в шприц через иглу 0,8· 40,

если нет иных указаний в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Суспензии».

pH. От 6,8 до 8,3. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия». Для испытания используют содержимое 5 ампул (флаконов) препарата, разведенного в 30 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, pH (7,1 ± 0,1).

Средняя масса и отклонения от средней массы. Коэффициент вариации массы вакцины в ампулах (флаконах) должен быть не более 5 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

Потеря в массе при высушивании. Не более 5,0 %. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов. Вакцина не должна содержать посторонних микроорганизмов и грибов. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» с использованием тиогликолевой среды.

Содержимое ампулы (флакона) ресуспендируют в 2 – 3 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида. По 1 мл восстановленной вакцины и отдельно – использованного растворителя засевают в 2 пробирки с 20 мл тиогликолевой среды в каждой. Посевы инкубируют в течение 5 – 7 сут по одной пробирке из каждого образца при температуре (36 ± 1) °С для выявления аэробных и анаэробных микроорганизмов и по одной пробирке при температуре 20 – 22 °С для выявления грибов.

Через 5 – 7 сут из каждой пробирки производят пересев по 0,5 мл в 2 пробирки, содержащие по 10 мл тиогликолевой среды, и инкубируют при указанных выше температурах. Через 14 сут выращивания со дня первичного посева из всех пробирок делают мазки, окрашивают их по Граму, просматривают под микроскопом при увеличении К 7×40.

Клетки сибиреязвенного микроба представляют собой неокрашенные споры и грамположительные палочки, различающиеся по размерам (мелкие, средние и крупные) и по форме (продолговатые или раздутые), расположенные поодиночке или в виде коротких и длинных цепочек.

В случае обнаружения хотя бы в одном из 10 просмотренных полей зрения грамотрицательной микрофлоры или грамположительных кокков препарат считается загрязненным посторонней микрофлорой. Если в повторном испытании результат будет таким же, препарат считают не выдержавшим испытание.

Специфическая безопасность. Вакцина должна быть безопасной. Испытание проводят на 2 кроликах массой 2 – 2,5 кг. Животных взвешивают и измеряют температуру в течение 3 сут и за 30 мин до проведения испытания.

Вакцину вводят подкожно в область внутренней поверхности бедра в дозе 250 млн спор в объеме 1 мл. Наблюдение проводят в течение 10 сут. Вакцина не должна вызывать гибель животных и на месте введения не должен развиться некроз или инфильтрат. Допускается потеря массы тела животного до 10 % от исходной величины в течение первых 8 сут и повышение температуры тела не более чем на 1 °С на 1 – 2 сут после введения вакцины.

При несоблюдении указанных требований проводят повторный контроль на удвоенном количестве животных. Если при повторном контроле результат будет таким же, препарат считают не выдержавшим испытание.

Специфическая активность

1. Общая концентрация спор. Общая концентрация (ОК) спор в зависимости от содержания в ампуле (флаконе) человеческих доз должна составлять 8 – 12 млрд спор/мл или 4 – 6 млрд спор/мл. Концентрацию спор определяют методом подсчета в камере Горяева. Содержимое ампулы (флакона) с вакциной ресуспендируют в 1 мл воды очищенной и делают последовательные десятикратные разведения в воде очищенной до исчезновения в последней пробирке отчетливо видимой мутности. Взвесью спор из этого разведе-

ния заполняют камеру Горяева и через 5 – 10 мин с помощью микроскопа с фазово-контрастным устройством (объектив 40×, окуляр 7×) подсчитывают количество спор в 10 больших квадратах сетки. Число спор (ОК) в 1 ампуле (1 мл) исходной вакцины определяют по формуле:

$$ОК = 25000 \cdot n \cdot p,$$

где: n – количество спор в 10 больших квадратах;

p – кратность разведения;

25000 – постоянная величина для камеры данного типа.

2. Количество живых спор. Количество живых спор должно составлять не менее 40 % от общей концентрации.

В исследованиях используют агар Хоттингера – аминный азот (230 ± 10) мг %, pH (7,2 ± 0,1) – или мясопептонный агар (МПА), pH (7,2 ± 0,1).

При определении содержания живых микробных клеток в вакцине используют концевые химически чистые пипетки и пробирки со стерильной водой очищенной.

Содержимое каждой из 3 ампул ресуспендируют в 1 мл стерильной воды очищенной, встряхивают до образования гомогенной взвеси. Содержимое каждой ампулы с помощью стерильных пипеток переносят в 3 стерильные колбы вместимостью 250 мл с 99 мл воды очищенной и фарфоровыми или стеклянными бусами и закрывают ватно-марлевыми пробками. Колбы помещают на шуттель-аппарат и выдерживают в течение 30 мин при температуре (20 ± 2) °С и скорости 50 покачиваний в минуту.

Исходя из общей концентрации спор, определенной в камере Горяева, взвесь спор десятикратно разводят водой очищенной до содержания примерно 1000 спор в 1 мл. Например, из взвеси спор, разведенной в колбе в 100 раз, делают 5 последовательных десятикратных разведений, используя для каждого разведения отдельную пипетку вместимостью 1 мл, и получают последнее разведение 10^{-7}, в котором будет содержаться 1000 спор/мл.

Из разведения, содержащего около 1000 спор в 1 мл, высевают по 0,1 мл на 5 чашек Петри с питательной средой, равномерно распределяя материал на поверхности среды стеклянным шпателем или методом покачивания. Чашки переворачивают и инкубируют при температуре (36 ± 1) °С в течение 24 – 36 ч, после чего подсчитывают количество выросших колоний на каждой чашке Петри.

Расчет концентрации живых спор (БК), выраженное количеством спор в 1 мл вакцины, проводят по формуле:

$$\text{БК} = \frac{2 \cdot n \cdot p}{3},$$

где: 2 – коэффициент пересчета на 1 мл пробы;
n – общее количество колоний, выросших на 15 чашках при высеве 0,5 мл каждой из 3 исследуемых проб;
p – кратность разведения.

Процентное содержание живых спор вычисляют по формуле:

$$\%\ \text{живых спор} = \frac{\text{БК}}{\text{ОК}} \cdot 100$$

3. Иммуногенность для морских свинок. Индекс иммунитета должен быть не менее 10000 (отношение величины LD_{50} заражающего тест-штамма *B. anthracis* 71/12 для иммунизированных животных к величине LD_{50} для неиммунизированных животных).

Иммунизируют испытуемой вакциной 20 морских свинок обоего пола массой (275 ± 25) г однократно подкожно в область внутренней поверхности бедра в дозе 50 млн спор в объеме 0,5 мл. Одновременно 20 контрольным морским свинкам вводят по 0,5 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида. Через 21 сут иммунизированных и неиммунизированных животных подкожно инфицируют тест-штаммом *B. anthracis* 71/12. Для заражения иммунизированных животных используют дозы 10^6; 10^7; 10^8 и 10^9 , разведенные из общего количества спор; для неиммунизированных животных используют дозы 10^2; 10^3; 10^4 и 10^5, также разведенные из общего количества спор тест-

штамма. Каждую заражающую дозу вводят в объеме 0,5 мл 5 иммунизированным и 5 неиммунизированным морским свинкам. За животными наблюдают в течение 10 сут. Погибших животных вскрывают и делают посевы путем отпечатков верхушек сердца на чашки Петри с питательной средой. Сибиреязвенную инфекцию подтверждают в случае обнаружения роста, характерного для сибиреязвенного микроба. Затем рассчитывают величины LD_{50} заражающей тест-культуры для иммунизированных и неиммунизированных животных и определяют индекс иммунитета.

При значении индекса иммунитета менее 10000 опыт повторяют по той же методике в сравнении со стандартным образцом. Если при повторном контроле результат будет таким же, препарат считают не выдержавшим испытание.

Растворители, выпускаемые в комплекте с препаратом. 30 % раствор глицерола в воде для инъекций.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственны средств» и ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование в течение 20 сут при температуре не выше 25 °С.

Вакцина сибиреязвенная комбинированная, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения

ФС.3.3.1.0017.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину сибиреязвенную комбинированную, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения, представляющую собой лиофилизированную в стабилизирующей среде смесь взвеси живых спор вакцинного штамма *Bacillus anthracis* СТИ-1 и концентрированного протективного сибиреязвенного антигена (ПА), адсорбированного на геле алюминия гидроксида.

Вакцина предназначена для профилактики сибирской язвы и обеспечивает развитие специфического иммунитета продолжительностью до 1 года.

ПРОИЗВОДСТВО

Вакцинный штамм *B. anthracis* СТИ-1 должен иметь типичные культуральные, морфологические, биохимические и генетические свойства; должен обладать остаточной вирулентностью для морских свинок (при введении 50 млн спор) и белых мышей (10 млн спор); должен вызывать гибель 50 – 70 % животных; должен быть специфически безопасным для кроликов при введении им 250 млн спор; индекс иммунитета для морских свинок должен быть не ниже 10000.

Перед приготовлением очередной серии вакцинного штамма проводят его анимализацию путем пассажа через организм морской свинки с последу-

ющим отбором типичных колоний, выросших на плотной питательной среде при посеве селезенки.

Технология изготовления вакцины сибиреязвенной комбинированной состоит из получения посевной культуры *B. anthracis* СТИ-1; глубинного культивирования посевной культуры *B. anthracis* СТИ-1 для получения нативной споровой культуры; приготовления концентрированной споровой взвеси; приготовления концентрированного протективного антигена (ПА) методом сепарирования нативной культуры штамма *B. anthracis* СТИ-1 с последующим концентрированием и стерилизующей фильтрацией на установках ультрафильтрации или методом микрофильтрации; сорбции концентрированного ПА на геле алюминия гидроксида; стабилизации сорбированного ПА формальдегидом с последующим промыванием в 0,9 % растворе натрия хлорида; смешивания сорбированного концентрированного ПА с концентратом споровой культуры *B. anthracis* СТИ-1 с последующим розливом, замораживанием, сублимационным высушиванием, герметизацией и упаковкой препарата. В качестве стабилизатора используется сахароза, разрешенная для использования при производстве иммунобиологических лекарственных препаратов.

На стадиях приготовления посевной и нативных культур контролируют pH, концентрацию спор, отсутствие посторонней микрофлоры. Качество ПА определяют по следующим показателям: стерильность, pH, содержание общего азота, алюминия гидроксида и формальдегида.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Пористая масса серовато-белого цвета.

Восстановленный препарат – гомогенная суспензия серовато-бежевого цвета без посторонних примесей и включений.

Подлинность. Определение подлинности вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1 проводят микроскопическим методом**.** В мазках, окрашенных по Цилю-Нильсену, должны наблюдаться овальные споры розового

цвета с красным ободком по периферии.

Определение подлинности ПА проводят методом иммунодиффузии в агаре по Оухтерлони с иммуноглобулином противосибиреязвенным лошадиным. Методика изложена в разделе «Специфическая активность».

Время растворения. Вакцина должна полностью растворяться течение 5 мин в 5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида при встряхивании.

Время седиментационной устойчивости. Суспензия не должна расслаиваться в течение 5 мин. Определение проводят в соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

Проходимость через иглу. Гомогенная взвесь, диспергированная путем встряхивания, должна свободно проходить в шприц через иглу 0,8· 40, если нет иных указаний в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Суспензии».

pH. От 7,1 до 7,3. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия». Для испытания используют содержимое 5 ампул (флаконов) препарата, разведенного в 25 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, pH (7,1 ± 0,1).

Средняя масса и отклонение от средней массы. Коэффициент вариации массы вакцины в ампулах (флаконах) должен быть не более 5 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

Потеря в массе при высушивании. Не более 5,0 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Общий азот. Не более 0,4 мг/мл. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение общего азота с реактивом Несслера в биологических лекарственных препаратах».

Алюминия гидроксид. Не более 2,7 мг/мл алюминия (III). Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение ионов алюминия в сорбированных биологических лекарственных препаратах».

Формальдегид. Не более 0,001 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение формальдегида в биологических лекарственных препаратах».

Полнота сорбции антигена. Надосадочная жидкость должна содержать не более 25 ЕА/мл (единиц активности в мл). Содержимое ампулы (флакона) ресуспендируют в 5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, перемешивают и отделяют осадок центрифугированием при 2000 об/мин в течение 30 мин. Отбирают 1 мл надосадочной жидкости и разводят в 2; 4 и 8 раз 0,2 М фосфатным буферным раствором, pH (7,2 ± 0,1). Определение полноты сорбции антигена проводят в реакции иммунодиффузии в агаре по Оухтерлони с иммуноглобулином противосибиреязвенным лошадиным. Приготовление агара, постановку реакции и расчет результатов анализа проводят, как описано в разделе «Специфическая активность».

Полноту сорбции оценивают по максимальному разведению супернатанта, при котором еще образуется видимая линия преципитации с иммуноглобулином противосибиреязвенным, и выражают в единицах активности, содержащихся в 1 мл (ЕА/мл).

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов. Вакцина не должна содержать посторонних микроорганизмов и грибов. Определение проводят, в соответствии с ФС «Вакцина сибиреязвенная живая».

Специфическая безопасность. Вакцина должна быть безопасной. Вакцину растворяют в 5 мл 0,9 % натрия хлорида для инъекций. Испытание проводят по методике, описанной в ФС «Вакцина сибиреязвенная живая». Животным вводят вакцину подкожно в область внутренней поверхности каждого бедра в объеме 1,25 мл (общий объем – 2,5 мл).

Специфическая активность

1. Количество живых спор. Процент живых спор на плотной питательной среде должен составлять не менее 30 от расчетной концентрации. В 1 мл препарата после ресуспендирования расчетная концентрация составляет (100 ± 20) млн спор *B. anthracis* СТИ-1.

В каждую из 3 ампул (флаконов) вносят 5 мл воды очищенной, встряхивают до образования гомогенной взвеси. Далее определение проводят по методике в соответствии с ФС «Вакцина сибиреязвенная живая».

2. Активность (ПА. Активность ПА должна быть не менее 50 ЕА/мл.

Определение проводят методом иммунодиффузии в агаре по Оухтерлони с иммуноглобулином противосибиреязвенным лошадиным. Для приготовления агара к 1 л 0,1 М фосфатного буферного раствора, pH (7,8 ± 0,1) добавляют 1 % агара, 1 % желатина и 0,25 % раствор фенола. Агар стерилизуют 15 мин при температуре (115 ± 2) °С и в горячем виде осветляют центрифугированием при 2000 об/мин в течение 5 мин. Готовый агар разливают в чашки Петри, помещенные на строго горизонтальную поверхность, слоем толщиной 6 мм. Стерильным штампом-пробойником вырезают 1 центральную и 6 радиальных лунок, расстояние между центрами которых составляет 10 мм (можно выполнять этот этап по трафарету). Агар из лунок удаляют.

Вакцину последовательно разводят 0,2 М фосфатным буферным раствором, pH (7,2 ± 0,1), до разведений 1:2; 1:4; 1:6; 1:8. В центральную лунку вносят 0,04 мл цельного иммуноглобулина противосибиреязвенного лошадиного, а в радиальные лунки по часовой стрелке – все разведения вакцины, начиная с цельного неразведенного препарата. Чашки помещают в эксикатор, содержащий воду очищенную, при температуре (19 ± 1) °С в течение 3 сут. Предварительный учет результатов проводят через 24 ч, окончательный – на 3 сут.

Активность ПА оценивают по максимальному разведению вакцины, при котором образуется видимая линия преципитации с иммуноглобулином противосибиреязвенным, и выражают в единицах активности (ЕА/мл).

Расчет ПА (*А*) в ЕА/мл проводят по формуле:

$$A = \frac{T}{V},$$

где: *T* – разведение вакцины, при котором наблюдается видимая линия преципитации;

V – объем пробы, внесенный в лунку, мл.

3. Иммуногенность для морских свинок. Индекс иммунитета должен быть не менее 25000 (отношение величины LD_{50} заражающего тест-штамма *B. anthracis* 71/12 для иммунизированных животных к величине LD_{50} для неиммунизированных животных). В 4 образца с вакциной вносят по 5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида для инъекций, встряхивают до образования гомогенной взвеси. Иммунизирующую дозу в объеме 0,5 мл вводят морским свинкам подкожно в область внутренней поверхности бедра. Далее определение проводят в соответствии с ФС «Вакцина сибиреязвенная живая».

4. Иммуногенность для кроликов. Препарат должен предохранять от гибели не менее 8 из 10 кроликов, привитых подкожно одной человеческой дозой вакцины, при подкожном инфицировании 100 LD_{50} вирулентного штамма сибиреязвенного микроба.

Испытание проводят на кроликах обоего пола массой (2,25 ± 0,25) кг. Животных иммунизируют однократно подкожно в область внутренней поверхности бедра в объеме 0,5 мл (одна человеческая доза вакцины). Одновременно 3 контрольным кроликам вводят по 0,5 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида.

Для определения LD_{50} тест-культуры *B. anthracis* Ч-7 интактных кроликов инфицируют дозами 10^1; 10^2; 10^3 и 10^4 спор. Каждую дозу вводят не менее чем 3 кроликам подкожно в паховую область задней конечности в объеме 1 мл. Наблюдение за животными проводят в течение 10 сут. Рассчитывают LD_{50} по методу Кербера в модификации И. П. Ашмарина.

Через 10 сут кроликов (10 иммунизированных и 3 контрольных – неиммунизированных) заражают 100 LD_{50} споровой культуры *B. anthracis* Ч-7. Наблюдение за животными проводят в течение 10 сут. Погибших животных вскрывают и делают посев 0,1 мл крови из сердца на чашки Петри с агаром Хоттингера, pH (7,2 ± 0,1). Сибиреязвенную инфекцию подтверждают в случае обнаружения роста, характерного для сибиреязвенного микроба. Зара-

женные контрольные (неиммунизированные) кролики должны погибнуть в течение 3 сут.

Растворители, выпускаемые в комплекте с препаратом. 0,9 % раствор натрия хлорида.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8°С.

Вакцина туберкулезная БЦЖ живая ФС.3.3.1.0018.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину туберкулезную БЦЖ живую, которая состоит из микобактерий вакцинного штамма *Mycobacterium bovis*, субштамм *BCG-1* (Russia), лиофилизированных в 1,5 % растворе стабилизатора – натрия глутамата моногидрат. Развивающийся в ответ на вакцинацию туберкулезной вакциной клеточный иммунный ответ в значительной степени зависит от активности макрофагов, в которых бактерии штамма БЦЖ размножаются. Механизм защиты заключается в ограничении распространения микобактерий туберкулеза из очага инфекции, что обусловлено формированием иммунологической памяти Т-лимфоцитов, выработка которых индуцирована первичной инфекцией вследствие БЦЖ-вакцинации.

Препарат предназначен для специфической профилактики туберкулеза.

ПРОИЗВОДСТВО

Все этапы производства вакцины должны осуществляться с соблюдением установленных требований организации производства и контроля качества лекарственного препарата, гарантирующих качество и безопасность для человека, обеспечивающих специфическую безопасность препарата, исключающих контаминацию чужеродными агентами. Работа должна проводиться в помещениях, оборудованных автономной приточно-вытяжной вентиляцией. Питательные среды перед посевом микобактерий должны быть провере-

ны на стерильность. Вакцину на всех стадиях производства контролируют на отсутствие посторонней микрофлоры.

Производственный штамм. Производство вакцины основано на системе посевного материала. Посевной материал (серия) – лиофилизат субштамма *M. bovis BCG-1*(Russia) из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов, России. Очередная посевная серия вакцинного штамма БЦЖ-1 должна быть изготовлена из наиболее ранней серии (первичной или вторичной посевной серии). Посевную серию готовят в объеме, обеспечивающем производство вакцины в течение не менее 10 лет, и хранят при температуре не выше минус 18 ^{o}C. Общее число пассажей для приготовления посевной и коммерческой серии не должно превышать 12.

Посевной материал (серия) должен быть идентифицирован как *M.bovis*, субштамм *BCG-1* (Russia) микробиологическими методами и подходящим молекулярно-биологическим методом. Содержит не менее 10 млн жизнеспособных клеток БЦЖ в 1 мг; не должен содержать вирулентных микобактерий туберкулеза. Определение проводится по разделу «Специфическая безопасность». Контроль проводится на 10 морских свинках в течение 12 недель, к концу этого срока должны оставаться живыми не менее 90 % животных. Не должен содержать посторонней микрофлоры; обладать высоким защитным действием, которое должно быть подтверждено в экспериментах на морских свинках путем сравнения с предыдущей серией посевного материала; вызывать минимальное число неблагоприятных реакций у привитых детей (но не более 0,06 % лимфаденитов после вакцинации). *M.bovis,* субштамм *BCG-1* (Russia) определяется при ежегодном мониторинге поствакцинальных осложнений.

Технологический процесс на всех стадиях производства и хранения должен обеспечивать защиту от прямого воздействия света и ультрафиолетового излучения.

Производство вакцины должно осуществляться клинически здоровым персоналом, не связанным с работой с другими инфекционными агентами.

Персонал не должен иметь риск туберкулезного инфицирования и должен проходить плановое периодическое обследование на отсутствие туберкулеза.

Количество микробных клеток БЦЖ и натрия глутамата моногидрата в дозе указывают в нормативной документации. Вакцину выпускают в комплекте с растворителем.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Пористая масса, порошкообразная или в виде тонкой ажурной таблетки белого или светло-желтого цвета, легко отделяющаяся от дна ампулы (флакона), гигроскопична.

Подлинность. При микроскопии мазков, окрашенных по Цилю-Нильсену, должны определяться окрашенные в красный цвет (кислотоустойчивые) тонкие, прямые или слегка изогнутые палочки длиной 1–4 мкм и шириной 0,3–0,5 мкм, часто с небольшими вздутиями на концах, не образующие спор и капсул. При посеве вакцины на плотную среду Левенштейна-Йенсена через 28–30 сут инкубации при температуре (37±1) ºС на поверхности среды должны вырастать характерные шероховатые плотные колонии от 0,5 до 8,0 мм в диаметре желтоватого цвета с тонкими неровными краями. Подлинность может быть подтверждена подходящим валидированным молекулярно-биологическим методом.

Время восстановления препарата. Не более 1 мин после добавления в ампулу (флакон) прилагаемого растворителя (0,9 % раствор натрия хлорида) с образованием грубодисперсной гомогенной суспензии. Допускается наличие хлопьев, которые должны разбиваться при 2–4-кратном перемешивании с помощью шприца или пипетки.

Общее содержание бактерий. Показатель оптической плотности должен быть в пределах от 0,30 до 0,40, что соответствует 1,0 мг/мл микробных клеток БЦЖ. Испытания проводят фотометрическим методом при длине волны (490 ± 3,0) нм в кювете с толщиной слоя 5 мм. В качестве контрольной пробы используют 0,9 % раствор натрия хлорида.

Вакцину разводят растворителем до содержания 1 мг/мл клеток БЦЖ. Проводят испытания не менее 10 образцов параллельно со стандартным образцом (СО) вакцины БЦЖ по методике, изложенной в нормативной документации.

Дисперсность. Показатель дисперсности должен быть не ниже 1,5. Испытания проводят фотометрическим методом (одновременно с определением общего содержания бактерий) по методике, изложенной в нормативной документации. Если по результатам анализа не более чем в 1 образце показатель дисперсности ниже 1,5, испытание проводят на 10 дополнительных образцах. При повторном испытании не допускается наличие образцов с показателем дисперсности ниже 1,5.

Потеря в массе при высушивании или Вода. Не более 5,0 %. Испытание проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании» или методом титрования с реактивом К.Фишера в соответствии с ОФС «Определение воды».

Герметичность. Ампулы/флаконы должны быть герметичны. Определение проводят только в ампулах/флаконах укупоренных под вакуумом.

Газовая среда в ампулах/флаконах с препаратом должна давать бледно-голубое или розово-голубое свечение (10 Па - 1000 Па) при возбуждении газовой среды высокочастотным электрическим полем (20 - 50 кГц при напряжении 15-20 кВ).

Отсутствие посторонних бактерий и грибов. Посторонняя микрофлора (бактерии, грибы) должна отсутствовать за исключением микобактерий БЦЖ. Определение проводят методом прямого посева в соответствии с ОФС «Стерильность».

Аномальная токсичность. Вакцина должна быть нетоксична. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

Специфическая безопасность. Вакцина не должна содержать вирулентных микобактерий. Испытание проводят на морских свинках одного пола массой от 250 до 350 г, не получающих какое-либо лечение или диету с

антибиотиками, способную повлиять на результаты теста (вводимая тест-доза 5 мг вакцины в 1 мл растворителя):

1) двум морским свинкам вводят вакцину под кожу внутренней поверхности бедра (наблюдают за животными не менее 12 нед). Животные должны оставаться здоровыми. По истечении срока наблюдения животных умерщвляют. При макроскопическом и, при необходимости, микроскопическом исследовании внутренних органов не должно быть признаков туберкулезной инфекции. При обнаружении признаков туберкулеза серию бракуют, выпуск последующих серий вакцины прекращают, а все имеющиеся запасы вакцины хранят до выявления причин случившегося.

При гибели до окончания срока наблюдения одной морской свинки, если у нее нет признаков туберкулезной инфекции, испытания повторяют.

2) шести морским свинкам вводят вакцину подкожно или внутримышечно (наблюдают в течение 6 недель; к концу срока наблюдения должны оставаться живыми не менее 5 животных). В конце периода наблюдения животных умерщвляют. При макроскопическом и, при необходимости, микроскопическом исследовании внутренних органов не должно быть признаков туберкулезной инфекции. При обнаружении признаков туберкулеза хотя бы у одного животного, серию бракуют, выпуск последующих серий вакцины прекращают, а все имеющиеся запасы вакцины хранят до выявления причин случившегося.

Животных, павших до окончания срока наблюдения вскрывают и исследуют, как описано выше. При гибели одной морской свинки без признаков туберкулезной инфекции тест считается завершенным, а препарат – специфически безопасным. При гибели двух животных испытания повторяют.

Специфическая активность. Оценивают по показателю жизнеспособности – числу жизнеспособных клеток БЦЖ в 1 мг вакцины. Верхнюю и нижнюю границы показателя указывают в нормативной документации. Применяют метод посева вакцины на плотную питательную среду Левенштейна-Иенсена. Посев проводят параллельно с СО или с референс-препаратом.

Термостабильность. При хранении вакцины в течение 4 недель при температуре (37±1) °С число жизнеспособных микробных клеток в 1,0 мг вакцины должно составлять не менее 25 % от их исходного числа, которое определяют в образцах, хранившихся при температуре от 2 до 8 °С. Испытанию подлежит каждая 5 серия препарата.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С.

Вакцина туляремийная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для внутрикожного введения и накожного скарификационного нанесения

ФС.3.3.1.0019.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину туляремийную живую, лиофилизат для приготовления суспензии для внутрикожного введения и накожного скарификационного нанесения, представляющую собой живую культуру вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, лиофилизированную в стабилизирующей среде.

Вакцина предназначена для профилактики туляремии и обеспечивает развитие специфического иммунитета продолжительностью до 5 лет.

ПРОИЗВОДСТВО

Технология производства вакцины предусматривает получение посевных культур I, II и III генераций штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ; процесс накопления биомассы, необходимой для приготовления микробной взвеси определенной концентрации; последующий розлив, замораживание, сублимационное высушивание; герметизацию и упаковку препарата. На стадиях приготовления посевных культур определяют pH, концентрацию микробных клеток, отсутствие посторонней микрофлоры.

Вакцинный штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ должен иметь типичные культуральные, морфологические, биохимические и антигенные свойства; остаточная вирулентность (LD_{50}) вакцинного штамма для белых мышей мас-

сой (19 ± 1) г должна находиться в пределах от 10^2 до $2 \cdot 10^6$ живых микробных клеток (м.к.); штамм не должен вызывать гибель морской свинки при введении дозы, равной $5 \cdot 10^9$ м.к; при накожной иммунизации морских свинок дозами $5 \cdot 10^6$ и $5 \cdot 10^7$ м.к. должен вызывать появление инфильтрата и гиперемии диаметром от 5 до 15 мм; при определении иммуногенности показатель ED_{50} для морских свинок должен быть не более 1000 микробных клеток.

Перед приготовлением производственной культуры вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ проводят его пассаж через организм морской свинки с последующим отбором типичных иммуногенных колоний SR-типа белого цвета, образующихся на плотной питательной среде при посеве селезенки и регионарных лимфатических узлов.

В качестве стабилизаторов используются вещества, разрешенные для производства иммунобиологических лекарственных препаратов.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Пористая масса белого с желтоватым оттенком цвета.

Восстановленный препарат – гомогенная мутная суспензия белого с желтоватым оттенком цвета без посторонних примесей, осадка или хлопьев. Определение проводят визуально.

Подлинность. Должна содержать чистую культуру вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Определение проводят иммунофлуоресцентным методом с использованием иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих туляремийных в соответствии с инструкцией по применению. В мазках из препарата должно наблюдаться специфическое ярко-зеленое свечение по периферии микробных клеток.

Время растворения. Должна полностью растворяться в течение 3 мин при добавлении 1 мл воды для инъекций при встряхивании.

Время седиментационной устойчивости. Суспензия не должна расслаиваться в течение 5 мин. Определение проводят в соответствии с ОФС «Суспензии».

Проходимость через иглу. Гомогенная суспензия, диспергированная путем встряхивания, должна свободно проходить в шприц через иглу 0,8· 40, если нет иных указаний в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Суспензии».

pH. От 6,8 до 7,2. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия». Для испытания используют 20 ампул, содержимое каждой ампулы растворяют в 1 мл воды для инъекций.

Потеря в массе при высушивании. Не более 4,0 %. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании». Для испытания используют 6 образцов.

Средняя масса и отклонение от средней массы. Коэффициент вариации массы вакцины в ампулах должен быть не более 5 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов. Вакцина не должна содержать посторонних микроорганизмов и грибов. Препарат должен представлять чистую живую культуру вакцинного штамма туляремийного микроба. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» с использованием тиогликолевой среды.

За один образец принимают содержимое двух ампул препарата. В ампулы вносят по 1 мл 0,9 % стерильного раствора натрия хлорида, перемешивают и по 1 мл каждого образца высевают в 2 пробирки, содержащие по 20 мл тиогликолевой среды. Одну пробирку из каждого образца инкубируют при температуре от 30 до 35 ^{o}C для выявления аэробных и анаэробных микроорганизмов, другую – при температуре от 20 до 25 ^{o}C для выявления грибов. Через 5 – 7 сут из каждой пробирки производят пересев по 0,5 мл в 2 пробирки, содержащие по 10 мл тиогликолевой среды, и инкубируют при

указанных выше температурах. Через 14 сут выращивания со дня первичного посева из всех пробирок делают мазки, окрашивают их по Граму и микроскопируют при увеличении 90×10.

В случае обнаружения хотя бы в одном из 10 просмотренных полей зрения грамположительных кокков или палочек препарат считается загрязненным посторонней микрофлорой.

При выявлении в мазках грамотрицательных палочек, отличающихся по морфологии от туляремийных бактерий, из этого образца готовят 3 мазка, которые обрабатывают иммуноглобулинами диагностическими, флуоресцирующими, туляремийными и просматривают в каждом мазке не менее 10 полей с помощью люминесцентного микроскопа. Если не все бактерии, обнаруживаемые в препарате, специфически окрашиваются ярко-зеленым свечением по периферии микробных клеток - препарат считают не выдержавшим испытание. При получении результатов контроля, не соответствующих установленной норме, проводят повторный контроль на удвоенном количестве образцов.

Специфическая безопасность. Вакцина должна быть безопасной и не вызывать гибель более одной морской свинки из 3.

Вакцина, введенная 3 морским свинкам массой (475 ± 25) г в объеме 1 мл подкожно в дозе $5 \cdot 10^9$ м.к., полученной в соответствии со стандартным образцом (СО) мутности (10 МЕ), эквивалентным $5 \cdot 10^9$ м.к./мл туляремийных бактерий, не должна вызывать гибель более одной морской свинки из трех в течение 15 сут наблюдения. У выживших свинок допускается падение массы тела, на месте введения возможен некроз тканей кожи и подкожной клетчатки.

В случае, если животные остаются живыми или наступает гибель одной морской свинки, препарат считают безопасным. В случае гибели 2 и более животных испытание повторяют на их удвоенном количестве. Если при повторном контроле наблюдается гибель аналогичного количества животных, препарат считают не выдержавшим испытание.

Специфическая активность

1. Концентрация микробных клеток. В препарате должно содержаться $(2 \pm 1) \cdot 10^{10}$ м.к. в 1 мл. Колебания результатов определений не должны превышать 5 % от средней арифметической величины.

Определение проводят в трех образцах (один образец – содержимое двух ампул). В две ампулы с вакциной вносят по 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, pH (7 – 7,2), и после получения гомогенной суспензии объединяют содержимое ампул. Из каждого образца 0,5 мл суспензии используют для определения концентрации микробных клеток в 1 мл вакцины. Для этого по 0,5 мл каждого образца вакцины вносят в отдельные стандартные пробирки и добавляют 0,9 % раствор натрия хлорида до соответствия СО мутности (10 МЕ).

Концентрацию микробных клеток (ОК) определяют по формуле:

$$\text{ОК} = \frac{(0{,}5 + V) \cdot 5 \cdot 10^9}{0{,}5},$$

где: V – объём 0,9 % раствора натрия хлорида, взятого на разведение пробы, мл;

0,5 – объём испытуемого образца, мл;

$5 \cdot 10^9$ – эквивалент туляремийного микроба, соответствующий СО мутности (10 МЕ), м.к./мл.

2. Количество живых микробных клеток. Количество живых микробных клеток должно составлять не менее 40 % от общего количества микробных клеток. Колебания результатов определений в образцах серии не должны превышать 20 % от средней арифметической величины.

При определении содержания живых микробных клеток в вакцине используют концевые химически чистые пипетки и пробирки с 0,9 % раствором натрия хлорида, охлажденные до температуры от 2 до 8 °С.

Для определения количества живых микробных клеток из приготов-

ленных ранее образцов суспензии вакцины делают последовательные десятикратные разведения от 10^{-1} (к 0,5 мл вакцины добавляют 4,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида) до 10^{-7}, используя для каждого разведения отдельную пипетку вместимостью 1 мл. Из последнего разведения по 0,1 мл взвеси отдельно для каждого образца высевают на 3 чашки Петри с отконтролированными рыбно-дрожжевым питательным агаром с добавлением цистеина или цистеина и глюкозы или с питательной средой для выделения и культивирования туляремийного микроба (FT-агар).

Учет результатов определения количества живых клеток в вакцине проводят через 5 сут выдерживания посевов при температуре (37 ± 1) °С.

За количество живых микробных клеток принимают среднюю арифметическую определений количества выросших колоний в 3 образцах. Полученную величину умножают на степень разведения культуры (10^{-7}) и увеличивают в 10 раз (для контроля используют 0,1 мл вакцины), получая количество живых туляремийных микробов, содержащихся в 1 мл вакцины.

Содержание живых микробных клеток в процентах (% живых м.к.) рассчитывают по формуле:

$$\%\ \text{живых м. к.} = \frac{\text{БК}}{\text{ОК}} \cdot 100\ ,$$

где: БК – количество живых м.к. в 1 мл;
ОК – общая концентрация, м.к.

3. Степень диссоциации. Число иммуногенных колоний SR-типа белого цвета должно составлять не менее 80 % от общего количества выросших колоний.

Количество колоний определяют на тех же чашках Петри с посевами, на которых определяют содержание живых микробных клеток. После инкубации чашек Петри в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 5 сут их помещают на 24 ч в холодильник при температуре от 2 до 8 °С. После этого

подсчитывают число иммуногенных колоний белого цвета и неиммуногенных колоний серого цвета и вычисляют их процентное соотношение.

4. Количество накожных доз. В ампуле должно содержаться от 15 до 50 накожных доз. Количество прививочных доз в ампуле устанавливается путем деления количества живых м.к. на $2 \cdot 10^8$ м.к., составляющих одну прививочную дозу.

5. Прививаемость. При накожной иммунизации морских свинок дозой $2 \cdot 10^7$ живых м.к. в объеме 0,1 мл у всех животных через 2 – 5 сут вокруг насечек должны образоваться инфильтрат и гиперемия диаметром от 5 до 15 мм.

В ампулу вносят воду для инъекций из расчета 0,1 мл на 1 накожную дозу. Полученную микробную взвесь разводят 0,9 % раствором натрия хлорида в 10 раз до концентрации $2 \cdot 10^8$ живых м.к. в 1 мл и прививают 3 морских свинок массой (400 ± 25) г накожно методом скарификации в объеме 0,1 мл. На участок депилированной кожи, предварительно обработанной спиртом и эфиром (1:1), после испарения эфира наносят пипеткой 2 капли микробной взвеси на расстоянии 20 – 30 мм друг от друга. Через каждую каплю оспопрививательным пером делают по 2 параллельные некровоточащие насечки длиной 8 – 12 мм. Нанесенную на кожу взвесь тщательно втирают в течение 1 мин плоской стороной пера.

Если препарат не выдерживает испытание, контроль повторяют по той же методике на удвоенном количестве животных.

6. Иммуногенность. Не менее 8 из 10 морских свинок, привитых накожно дозой $2 \cdot 10^7$ живых м.к. в объеме 0,1 мл, должны быть предохранены от гибели при подкожном заражении 1000 Dcl (Dosis certa letalis) вирулентного штамма туляремийных бактерий голарктической расы, 1 Dcl которого не должна превышать 5 м.к. Частота контроля иммуногенности указывается в нормативной документации производителя.

Иммунизируют 10 морских свинок массой (350 ± 50) г дозой $2 \cdot 10^7$ м.к. в объеме 0,1 мл накожно скарификационным методом, как при определении прививаемости.

Через 25 – 30 сут после иммунизации проводят заражение иммунизированных животных дозой 1000 Dcl, а 3 неиммунизированных (контрольных) животных заражают 1 Dcl вирулентного штамма *F. tularensis.* Наблюдение за зараженными животными ведут в течение 30 сут.

Все контрольные животные должны погибнуть от туляремии в срок до 15 сут. У них должны наблюдаться типичные патологоанатомические изменения (плотный инфильтрат на месте введения, гиперемия сосудов подкожной клетчатки и паховых лимфатических узлов, увеличение и уплотнение селезенки и печени). Всех павших животных вскрывают, органы и ткани высевают методом отпечатков на чашки Петри с рыбно-дрожжевым агаром с добавлением цистеина и глюкозы или FT-агаром с добавлением 5 % крови.

В случае гибели более 2 свинок из 10 иммунизированных и всех зараженных животных испытание повторяют по той же методике в сравнении со стандартным образцом вакцины туляремийной живой.

Если при повторном контроле погибли более 2 свинок из 10 иммунизированных и зараженных, а для стандартного образца эти показатели остались в пределах нормы – данную серию считают не выдержавшей испытание.

Термостабильность. Не менее 7 сут. Показатель термостабильности (срок, в течение которого в препарате сохраняется 50 % живых микробных клеток по отношению к первоначальному количеству) определяют в 3 образцах после хранения вакцины при температуре (37 ± 1) °С в течение 14 сут.

Методика определения количества живых микробных клеток изложена в разделе «Специфическая активность».

Показатель термостабильности (t) в сут рассчитывают по формуле:

$$t = \frac{0{,}3 \cdot 14}{lg\, A_0 - lg\, A_n},$$

где: $lg\, A_0$ – среднее значение первоначального количества живых микробных клеток из трех образцов, м.к./мл;

$lg\ A_n$ – среднее значение полученного количества живых микробных клеток из трех образцов после хранения вакцины при температуре (37 ± 1) °С; м.к./мл

0,3 – постоянная величина;

14 – срок хранения вакцины при температуре (37 ± 1) °С, сут.

Растворитель, выпускаемый в комплекте с вакциной. Вода для инъекций в ампулах по 5 мл.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С.

Вакцина холерная бивалентная химическая, таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой	ФС.3.3.1.0020.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину холерную бивалентную химическую, таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой, которая представляет собой смесь холерогена-анатоксина и О-антигена, полученных из инактивированных штаммов классического биовара 569 В *V. cholerae* О1, серовара Инаба и
М-41 серовара Огава.

Вакцина предназначена для профилактики холеры и вызывает развитие специфического иммунитета длительностью до 6 мес.

ПРОИЗВОДСТВО

Технология производства вакцины холерной бивалентной химической предусматривает культивирование штаммов-продуцентов в жидких питательных средах (3 пассажа); инактивирование культур формалином; последующее выделение из полученной биомассы *V. cholerae* О1 сероваров Инаба и Огава специфических фракций холерогена-анатоксина и О-антигенов; их очистка, концентрирование аммонием сернокислым; сублимационное высушивание; смешивание с разрешенными для использования в производстве вакцины холерной бивалентной химической наполнителями, таблетирование и покрытие таблеток кислотоустойчивой оболочкой из целлацефата (ацетилфталилцеллюлоза).

Для производства вакцины используют штаммы *V. cholerae* O1 – гиперпродуценты холерного экзотоксина (холерогена), несущие гены, ответственные за синтез холерного токсина (ctx A, B) и О-антигена. Производственные штаммы *V. cholerae* O1 должны, иметь типичные культурально-морфологические, биохимические и антигенные свойства; обладать холерогенными, токсигенными и иммуногенными свойствами.

В процессе производства вакцины проводят контроль чистоты и концентрации бактериальной культуры, контроль стерильности инактивированной культуры, контроль диализа специфических фракций, контроль на отсутствие сульфат - ионов и ионов аммония.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Таблетка – серовато-желтая компактная масса, покрытая светлой блестящей кислотоустойчивой оболочкой**.**

Подлинность. Одна таблетка должна содержать (100000 ± 20000) единиц связывания холерогена-анатоксина (ЕС) и иметь обратный показатель титра в РНГА О1-антигена штаммов *V. cholerae* не менее 2000 условных единиц. Методика определения изложена в разделе «Специфическая активность».

Распадаемость. Определение проводят в соответствии с ОФС «Распадаемость таблеток и капсул».

Средняя масса таблетки. От 0,285 до 0,315 г. Определение проводят в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

pH восстановленного препарата. От 6,7 до 7,4. Таблетку растворяют в 50 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Потеря в массе при высушивании. Не более 5,0 %**.** На каждый из 2 параллельных анализов используют навеску из 3 измельченных таблеток.

Определение проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Формальдегид. Не более 2 мг/мл. 2 таблетки предварительно растирают в ступке, добавляют 10 мл воды очищенной, перемешивают до получения суспензии, центрифугируют в течение 15 мин при 6000 об/мин. Отбирают 2 мл прозрачной надосадочной жидкости и доводят водой очищенной до 5 мл. Далее определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение формальдегида в биологических лекарственных препаратах».

Микробиологическая чистота. В 1 таблетке допускается не более 1000 колоний непатогенных микроорганизмов. Вакцина не должна содержать патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

На испытание одного образца используют 5 таблеток. Определение проводят в соответствии с правилами асептики. Каждую таблетку берут пинцетом, ополаскивают стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида, pH (7,2 ± 0,1), и помещают в фарфоровую ступку с пестиком, прикрытую марлевой салфеткой; вносят 20 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, тщательно растирают в течение 1 – 2 мин, переносят во флакон вместимостью 100 мл и перемешивают до образования гомогенной суспензии. По 0,2 мл суспензии высевают пипеткой на 10 чашек Петри с мясопептонным агаром (МПА), pH (7,3 ± 0,1), на 5 чашек с МПА с добавлением 3 – 5 % дефибринированной бараньей крови и по 1 мл вносят во флакон с 50 мл 10 % желчного бульона, pH (7,4 ± 0,1). Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 48 ч. После инкубации по 0,2 мл из флакона с желчным бульоном высевают на 5 чашек с агаром Эндо и инкубируют в течение 48 ч при температуре
(37 ± 1) °С.

Учет результатов. Подсчитывают число колоний, выросших на 10 чашках. Петри с МПА. Если при посеве на МПА выросло более 1000 колоний непатогенных микробов на 1 таблетку, препарат контролируют повторно на удвоенном количестве образцов. Если при повторном контроле число выросших колоний превысит 1000, серию вакцины бракуют.

Пример расчета: 5 таблеток одной серии восстановлены в 20 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, то есть 1 таблетка восстановлена в 4 мл; далее делают высев в объеме 0,2 мл на одну чашку Петри и, соответственно на 10 чашек Петри с МПА – 2 мл. Если сумма выросших колоний составляет 500, то на 1 таблетку приходится 1000 колоний непатогенных микробов.

Не допускается наличие колоний, дающих зону гемолиза, на МПА с дефибринированной бараньей кровью. На среде Эндо должны отсутствовать как бесцветные, так и красные с металлическим блеском колонии.

Аномальная токсичность. Вакцина должна быть нетоксичной. Испытание проводят на беспородных белых мышах обоего пола массой (19 ± 1) г.

Соблюдая условия асептики, 2 таблетки от серии берут пинцетом, ополаскивают 0,9 % раствором натрия хлорида, помещают в фарфоровую ступку с пестиком, добавляют 160 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и тщательно растирают таблетки в течение 1 – 2 мин, содержимое переносят во флакон вместимостью 100 мл и тщательно перемешивают до образования гомогенной суспензии. Полученную суспензию в объеме 0,5 мл вводят подкожно в область спины вдоль позвоночника 10 животным. Животные должны оставаться живыми в течение 7 сут без видимых признаков заболевания. Масса каждого животного в день окончания наблюдения не должна быть меньше исходной. Если в течение периода наблюдения регистрируется гибель, уменьшение массы, заболевание, развитие некроза или абсцесса в месте введения хотя бы у 1 животного, испытание повторяют на удвоенном количестве белых мышей. Повторное испытание считается удовлетворительным, если препарат отвечает установленным требованиям.

Специфическая безопасность. Вакцина должна быть специфически безопасной.

Определение проводят на 2 кроликах массой (2,75 ± 0,25) кг со светлой кожей. За 24 ч до постановки испытания ножницами выстригают шерсть на

боковой поверхности тела размером 30·15 см, затем остатки шерсти удаляют кремом-депилятором.

Испытанию подлежит смесь из 3 таблеток. Таблетки пинцетом помещают в ступку и растирают в 75 мл 0,9 % раствора натрия хлорида до получения суспензии (разведение 1:25). Затем 1 мл суспензии вносят в пробирку, содержащую 9 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, получая разведение вакцины 1:250. Далее в ряд пробирок вносят по 1 мл этого разведения и добавляют 3; 5 и 7 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, получая разведения 1:1000; 1:1500 и 1:2000 соответственно. По 0,2 мл каждого разведения переносят в пробирки, добавляют к ним по 0,6 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, получая конечные разведения 1:4000; 1:6000; 1:8000, которые соответствуют 4000; 6000; 8000 ЕС анатоксина в 0,1 мл или соответственно 40 000; 60 000 и 80 000 ЕС/мл. Каждое разведение вводят 2 кроликам в объеме 0,1 мл внутрикожно на расстоянии 30 мм друг от друга, начиная с последнего разведения 1:8000.

Учет результатов проводят через 24 ч, измеряя размер папул линейкой. Вакцина специфически безопасна, если при внутрикожном введении в разведении не более 1:6000 (60000 ЕС/мл) не образуются или образуются папулы диаметром до 10 мм. Если размер папул хотя бы у 1 кролика больше 10 мм, испытание повторяют на том же количестве животных. Если при введении вакцины в разведении 1:8000 наблюдаются папулы диаметром 5 мм и более, серию вакцины бракуют.

Специфическая активность

*1. **Антигенная активность по анатоксинсвязыванию**.* Одна таблетка должна содержать (100000 ± 20000) единиц связывания анатоксина (ЕС). Испытание проводят на 2 кроликах массой (2,75 ± 0,25) кг со светлой кожей. Подготовка боковой поверхности кожи кролика изложена в разделе «Специфическая безопасность». В испытании используют стандартные образцы (СО) холерного тест-токсина сухого (далее тест-токсин) и сыворотки антихолерогенной сухой (далее сыворотка).

Разведение СО сыворотки антихолерогенной сухой. Содержимое ампулы СО сыворотки антихолерогенной сухой растворяют в 1 мл воды очищенной, переносят во флакон объемом 100 мл и разводят водой очищенной до получения разведения сыворотки 80 АЕ/мл.

Разведение СО холерного тест-токсина сухого. В ампулу СО холерного тест-токсина сухого вносят 1 мл воды очищенной, переносят во флакон объемом 100 мл и разводят водой очищенной до получения 20 опытных доз в 1 мл раствора.

Определение ЕС проводят в смеси из 3 таблеток. Таблетки растирают в ступке, добавляют 75 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и растворяют до получения гомогенной суспензии (разведение 1:25). Затем 1 мл переносят в пробирку и добавляют 9 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, получая разведение 1:250. Далее делают ряд последовательных разведений 1:1000; 1:1500; 1:2000; 1:2500; 1:3000 и 1:3500 в 0,9 % растворе натрия хлорида. По 0,2 мл каждого разведения переносят в пробирки и добавляют по 0,2 мл сыворотки, содержащей 80 АЕ/мл, получая разведения вакцины от 1:2000 до 1:7000. Пробирки выдерживают в течение 30 мин при температуре
(37 ± 1) °С. После инкубации в каждую пробирку добавляют по 0,4 мл 20 опытных доз/мл тест-токсина, получая разведения от 1:4000 до 1:14000. Пробирки встряхивают и выдерживают при температуре (37 ± 1) °С в течение 30 мин. По 0,1 мл содержимого каждой пробирки вводят внутрикожно на расстоянии 30 мм 2 кроликам в депилированный участок кожи, начиная с разведения 1:14000.

Одновременно на тех же кроликах определяют 1 АЕ сыворотки. В ряде пробирок готовят разведения антитоксической сыворотки в 0,9 % растворе натрия хлорида, содержащие 80; 60; 40; 30 и 20 АЕ в 1 мл. По 0,2 мл каждого разведения сыворотки переносят в пробирки и добавляют по 0,2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и по 0,4 мл из разведения тест-токсина, содержащего 20 опытных доз/мл, получая содержание в сыворотке 2; 1,5; 1; 0,75; 0,5 АЕ. Пробирки выдерживают при температуре (37 ± 1) °С в течение 30 мин.

После инкубации по 0,1 мл каждого разведения вводят внутрикожно 2 кроликам, начиная с 2 АЕ (контрольный ряд).

Учет результатов. Учет результатов проводят через 24 ч. Положительной реакцией в опытных рядах при введении разведений 1:8000; 1:10000; 1:12000 считают зону отека диаметром от 5 до 10 мм. Размер папулы в опытном ряду должен быть равен размеру папулы в контрольном ряду, где 1 опытная доза тест-токсина связала 1 АЕ сыворотки.

Принимая во внимание значительные колебания индивидуальной чувствительности кожи кроликов, расчет антигенной активности по ЕС проводят по одному из 4 вариантов:

1 вариант – положительная реакция в контрольном ряду наблюдается с сывороткой 1; 0,75 и 0,5 АЕ и отсутствует в разведениях 2 и 1,5АЕ; следовательно, 1 опытная доза тест-токсина связала 1 АЕ сыворотки. Наибольшее разведение вакцины, при введении которой наблюдается положительная кожная реакция у 2 кроликов в опытном ряду, например, 1:8000, следовательно, в 0,1 мл вакцины содержится 8000 ЕС или 80000 ЕС в 1 мл (в 1 таблетке).

2 вариант – положительная реакция в контрольном ряду наблюдается в разведениях сыворотки 0,75 и 0,5 АЕ; следовательно, 1 опытная доза тест-токсина связала 1,25 АЕ (2 АЕ – 0,75 АЕ) сыворотки. Наибольшее разведение вакцины, при введении которого наблюдается положительная кожная реакция у 2 кроликов в опытном ряду, например, 1:8000. Так как токсин связал 1,25 АЕ, расчет количества ЕС в препарате проводят путем умножения 1,25 · 8000, следовательно, в 0,1 мл содержится 10000 ЕС или 100000 ЕС в 1 мл (в 1 таблетке).

3 вариант – положительная реакция в контрольном ряду наблюдается в разведениях сыворотки 1,5; 1; 0,75 и 0,5 АЕ и отсутствует только с разведением 2 АЕ; следовательно, 1 опытная доза тест-токсина связала 0,5 АЕ (2 АЕ – 1,5 АЕ) сыворотки. Например, наибольшее разведение вакцины, при введе-

нии которой наблюдается положительная кожная реакция у 2 кроликов в опытном ряду, 1:8000. Так как токсин связал 0,5 АЕ, расчет количества ЕС в препарате проводят следующим образом: 0,5 · 8000, следовательно, в 0,1 мл содержится 4000 ЕС или 40000 ЕС в 1 мл (в 1 таблетке).

4 вариант – если положительная реакция в контрольном ряду наблюдается хотя бы у 1 кролика при разведении 0,5 АЕ или во всех разведениях сыворотки – 2; 1,5; 1; 0,75 и 0,5 АЕ, то учет результата не проводят и постановку испытания повторяют на 2 кроликах. Повторное испытание считается удовлетворительным, если препарат отвечает установленным требованиям по вариантам 1, 2 или 3.

2. ***Содержание О-антигена.*** Одна таблетка должна содержать не менее 2000 условных единиц О-антигена вакцинных штаммов *V. cholerae* O1 (обратный показатель титра в РНГА).

Для испытания используют 3 таблетки. Каждую таблетку тщательно растирают в отдельной ступке, добавляют 10 мл воды очищенной. Содержимое каждой ступки переносят в отдельные флаконы вместимостью 100 мл и оставляют для осаждения на 10 – 15 мин при температуре
(20 ± 2) °С. По 5 мл надосадочной жидкости из каждого флакона переносят в пробирки и добавляют по 2 капли 40 % раствора натрия гидроксида; выдерживают на водяной бане при температуре (100 ± 1) °С в течение 2 мин, охлаждают водопроводной водой до температуры (19 ± 1) °С и добавляют пастеровской пипеткой по капле 0,5 % раствор розоловой кислоты до окрашивания растворов в ярко-розовый цвет. Далее в пробирки добавляют по каплям (2 – 4 капли) ледяную уксусную кислоту до перехода окрашивания растворов в желтый цвет. Затем по каплям (от 2 до 7 капель) вносят 10 % раствор натрия углекислого до появления бледно-розового окрашивания. Для постановки реакции непрямой (пассивной) гемагглютинации (РНГА) каждую пробу вакцины дополнительно разводят 1:3 и 1:7. Для постановки РНГА используют неразведенную (цельную) пробу и полученные разведения.

Постановка РНГА (микрометод). Постановку РНГА проводят на 3 полистироловых планшетах с круглодонными лунками. В 8 лунок 6 рядов каждого планшета вносят по 0,025 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. В первые лунки каждого ряда вносят по 0,025 мл следующих образцов: в 1 – 2 ряды – цельной пробы, в 3 – 4 ряды – разведение 1:3, в 5 – 6 ряды – разведение 1:7; и делают последовательные двукратные разведения до восьмой лунки (из восьмой лунки 0,025 мл удаляют в емкость с дезинфицирующим раствором), получая разведения: в 1 – 2 рядах – от 1:2 до 1:256, в 3 – 4 рядах – от 1:6 до 1:768, в 5 – 6 рядах – от 1:14 до 1:1792. После этого в лунки всех рядов добавляют по 0,025 мл 50 % взвеси формалинизированных эритроцитов барана, разведенных в 50 раз. Содержимое лунок перемешивают покачиванием планшетов, оставляют на 15 мин при температуре (20 ± 2) °С и затем во все лунки вносят по 0,05 мл сыворотки холерной О1 агглютинирующей адсорбированной в разведении 1:2. Планшеты оставляют при температуре (20 ± 2) °С в течение 24 ч.

Постановка контроля формалинизированных эритроцитов барана. В контрольную лунку вносят 0,025 мл взвеси разведенных в 50 раз эритроцитов барана и добавляют 0,075 мл 0,9 % раствора натрия хлорида.

Учет результатов РНГА. Результат считают положительным при наличии гемагглютинации (эритроциты выпадают на дно лунки равномерным слоем в виде «зонтика», занимая не менее 2/3 сферической поверхности лунки; в ряде случаев может наблюдаться фестончатое оплывание краев агглютината).

Результат считают отрицательным при отсутствии гемагглютинации (эритроциты выпадают на дно лунки в виде темно–коричневой полусферы или узкого колечка с ровным краем – «пуговки»). В контрольных лунках результат должен быть отрицательным.

Последние лунки ряда, в которых наблюдается положительная гемагглютинация, учитывают как показатели титров в РНГА, определяющие

разведения вакцины. Рассчитывают среднее арифметическое значение обратных показателей титров в РНГА 3 разведений (в 2 повторностях) и умножают на 10 (разведение таблетки). Обратная величина титра РНГА соответствует содержанию О1-антигена вакцинных штаммов *V. cholerae* в условных единицах в 1 таблетке. Колебания результатов обратных показателей титров в РНГА в таблетках не должны превышать 5 % от средней арифметической величины.

Иммуногенностъ. ED_{50} должна быть не более 1/20000 части таблетки. Для испытания используют 2 таблетки, которые растирают в стерильной ступке и добавляют 10 мл 0,9 % раствора натрия хлорида (в 0,5 мл – 1/10 часть таблетки). Затем делают десятикратные последовательные разведения в 0,9 % растворе натрия хлорида, получая в 0,5 мл от 1/100 до 1/1000 части таблетки. После чего делают последовательные пятикратные разведения в 0,9 % растворе натрия хлорида, содержащие в 0,5 мл от 1/5000 до 1/125000 части таблетки. Таким образом, получают 4 иммунизирующие дозы, содержащие 1/1000, 1/5000, 1/25000 и 1/125000 часть таблетки в объеме 0,5 мл каждая. Каждую дозу вводят в объеме 0,5 мл однократно внутрибрюшинно 16 беспородным белым мышам обоего пола массой
(11 ± 1) г.

Через (13 ± 1) сут по 8 иммунизированных животных заражают дозой 300 LD_{50} (допускается доза от 50 до 500 LD_{50}) внутрибрюшинно взвесью 3 – 4-часовых агаровых культур *V. cholerae* О1 биовара Эльтор, серовара Инаба и *V. cholerae* О1 биовара Эльтор, серовара Огава в объеме 0,5 мл.

Подготовка штаммов для заражения описана в нормативной документации производителя. Для контроля берут по 10 белых мышей на каждый штамм для заражения, вводят им ту же дозу LD_{50}, что и иммунизированным животным.

Учет результатов. Наблюдение за животными ведут в течение 3 сут. В группах иммунизированных и заражённых животных для определения ED_{50}

подсчитывают количество выживших. В группе зараженных белых мышей для определения 1 LD_{50} подсчитывают количество павших животных. В контрольной группе животных, зараженных 300 LD_{50}, допустимо выживание от 1 до 3 белых мышей для каждого штамма.

По методу Кербера в модификации И. П. Ашмарина подсчитывают ED_{50} и LD_{50} для каждого заражающего штамма. Если величина ED_{50} хотя бы одного из заражающих штаммов будет выше допустимого значения, контроль повторяют на том же количестве животных. Если при повторном испытании величина ED_{50} вновь превысит допустимый предел, серию бракуют.

Если при расчете величины заражающей дозы будет установлено, что она содержит менее 50 или более 500 LD_{50}, контроль повторяют на том же количестве животных. Если в контрольной группе животных, зараженных 300 LD_{50}, выживет более 3 белых мышей, контроль повторяют на том же количестве животных.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С.

Вакцина чумная живая, таблетки для рассасывания **ФС.3.3.1.0021.15**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину чумную живую, таблетки для рассасывания, представляющую собой лиофилизированную живую культуру вакцинного штамма чумного микроба *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ.

Вакцина предназначена для профилактики чумы и вызывает развитие специфического иммунитета длительностью до 1 года.

ПРОИЗВОДСТВО

Все этапы производства вакцины должны гарантировать соблюдение установленных надлежащих правил, а также качество лекарственного препарата, гарантирующее его безопасность для человека.

Вакцинный штамм *Y. pestis* EV линии НИИЭГ должен обладать типичными морфологическими, культуральными и биохимическими свойствами; содержать плазмиды pFra, пестициногенности (pPst) и кальций зависимости (pCad) с молекулярными массами 60 , ≈ 6 и ≈ 47 MDa соответственно; не должен вызывать гибели морских свинок и потери их массы при введении им дозы $15 \cdot 10^9$ микробных клеток (м.к.). Иммуногенность штамма по величине ED_{50} при подкожном введении не должна превышать для морских свинок $1 \cdot 10^3$ м.к., для белых мышей – $1 \cdot 10^4$ м.к.

Перед приготовлением очередной серии вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ проводят его пассаж через организм морской свинки с последующим отбором типичных колоний, выросших на чашках Петри из посевов селезенки или регионарных лимфатических узлов.

Технология изготовления вакцины предусматривает получение посевных культур *Y. pestis* EV линии НИИЭГ I, II и III генераций; процесса накопления биомассы, необходимой для приготовления микробной взвеси определенной концентрации; последующий розлив, замораживание, сублимационное высушивание; приготовление гранулята и таблеток; фасовку и упаковку препарата.

В зависимости от технологии приготовления вакцины в процессе производства используются вспомогательные вещества, разрешенные для использования в иммунобиологической промышленности: лактоза, декстрин, тиомочевина, аскорбиновая кислота, глюкоза, ментол, крахмал картофельный, какао-порошок, ванилин, кальция стеарат.

На стадиях приготовления посевных культур определяют pH, концентрацию микробных клеток и отсутствие посторонней микрофлоры.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Таблетка светло-коричневого цвета правильной круглой формы с цельными краями, ровной и плоской поверхностью. Имеет запах какао, ванилина и ментола. Определение проводят органолептически.

Подлинность. Должна содержать чистую культуру вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ. Определение проводят иммунофлуоресцентным методом. Таблетку вакцины растирают в ступке, добавляют 49 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и тщательно перемешивают. Из полученной суспензии готовят три мазка, которые окрашивают иммуноглобулинами чумными диагностическими флуоресцирующими и просматривают под фазовоконтрастным и люминесцентным микроскопами не менее 50 полей зрения в каждом. В мазках из препарата микробные клетки должны светиться по периферии ярко-зеленым цветом. Допускается наличие не более 1 неокрашенной микробной клетки в 50 полях зрения.

Распадаемость. Таблетка должна распадаться в течение 15 мин. Определение проводят в соответствии с ОФС «Распадаемость таблеток и капсул».

Средняя масса. От 0,6 до 1,0 г. Определение проводят в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

pH растворенного препарата. От 6,8 до 7,4. Таблетку растворяют в 50 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Потеря в массе при высушивании. Не более 10,0 %. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании». На каждый из двух параллельных анализов используют навеску из 3 измельченных таблеток.

Микробиологическая чистота. Таблетка может содержать не более $1 \cdot 10^3$ микробных клеток (м.к.) бактерий непатогенных микроорганизмов.

Таблетку берут стерильным пинцетом, помещают во флакон вместимостью 100 мл, содержащий 49 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида. Флакон закрывают стерильной пробкой, устанавливают на платформу шуттель-аппарата и тщательно перемешивают до полного растворения таблетки и по 0,5 мл засевают на 5 чашек Петри с агаром Хоттингера, pH (7,1 ± 0,1). Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) ºС в течение 5 сут, после чего подсчитывают число выросших колоний.

Количество живых микробных клеток (N) непатогенных микроорганизмов в таблетке рассчитывают по формуле:

$$N = \frac{\sum_n \cdot 49}{0{,}5 \cdot m} \quad (1)$$

где: $\sum_n$ – суммарное количество колоний, выросших на чашках Петри;

49 – объем 0,9 % раствора натрия хлорида, использованного для растворения таблетки, мл;

m – количество чашек Петри, использованных для посева; шт;

0,5 – объем суспензии, высеваемой на 1 чашку, мл.

При обнаружении хотя бы в одной таблетке более $1 \cdot 10^3$ живых м.к. испытание повторяют на удвоенном количестве таблеток. Если при повторном

испытании число посторонних микроорганизмов в таблетке превышает $1x10^3$ м.к., препарат считают не выдержавшим испытание.

Специфическая безопасность. Вакцина должна быть специфически безопасной. Испытание проводят на морской свинке массой (275 ± 25) г.

Таблетку вакцины растирают в ступке, добавляют 49 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и тщательно перемешивают., Полученную суспензию разводят до концентрации $15 \cdot 10^9$ м.к./мл и вводят подкожно 1 мл одной морской свинке в область внутренней поверхности бедра.

На 6-е сутки морскую свинку взвешивают, подвергают эвтаназии, отмечают патологоанатомические изменения, обнаруживаемые при вскрытии. Печень, селезенку, легкие, регионарные лимфатические узлы, кровь и ткани из места введения высевают методом отпечатков на чашку Петри с агаром Хоттингера, pH (7,2±0,1), с добавлением натрия сернистокислого в количестве 0,25 г на 1 л среды, и чашку Петри с агаром Хоттингера, pH (7,2±0,1), с добавлением генцианвиолета в количестве 0,05 г на 1 л среды. Посевы инкубируют при температуре (27 ± 1) ^oC в течение 3 сут.

Вакцина не должна вызывать у морской свинки потери массы к 6 сут после введения больше, чем на 20 %, не должна вызывать видимых патологоанатомических изменений в легких – кровоизлияний, очагов воспаления, гранулем, абсцессов; в посевах крови и легких не должно быть роста чумного микроба. В месте введения допускается развитие кровоизлияния и инфильтрата подкожной клетчатки, переходящих в некроз. Во внутренних органах (селезенка и печень) допустимо развитие ограниченной узелковой реакции.

Специфическая активность

1. Содержание живых микробных клеток. Таблетка должна содержать от $30 \cdot 10^9$ до $50 \cdot 10^9$ живых микробных клеток вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ.

При определении количества живых микробных клеток в вакцине используют концевые химически чистые пипетки, пробирки с 0,9 % раствором натрия хлорида должны быть охлаждены до температуры 2 до 8 ^oC.

Таблетку растирают в ступке, добавляют 49 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и тщательно перемешивают. Полученную суспензию вакцины разводят в 0,9 % растворе натрия хлорида последовательно десятикратно от 10^{-1} до 10^{-7}, используя для каждого разведения отдельную пипетку. Из разведения 10^{-7} высевают по 0,1 мл на 5 чашек Петри с агаром Хоттингера с добавлением стимулятора роста (кровь гемолизированная до 1 % концентрации или натрий сернистокислый (0,25 г на 1 л среды).

Посевы инкубируют в течение 3 сут при температуре (27 ± 1) ºС, затем подсчитывают общее количество колоний на 5 чашках Петри. Количество живых микробных клеток (N) в таблетке рассчитывают по формуле:

$$N=\frac{\sum_n \cdot 10^8 \cdot 49}{m} \quad (2)$$

где: $\sum_n$ – суммарное количество колоний, выросших на чашках;

10^8 – степень разведения;

49 – объем 0,9 % раствора натрия хлорида, использованного для растворения таблетки, мл;

m – количество чашек Петри, используемых для посева.

2. Иммуногенность. ED_{50} для морских свинок не должна превышать $1 \cdot 10^4$, для белых мышей – $4 \cdot 10^4$ живых микробных клеток.

Испытания проводят на морских свинках массой (275 ± 25) г и на белых нелинейных мышах массой (19 ± 1) г 3 таблетки вакцины чумной живой растирают в ступке и растворяют в 0,9 % растворе натрия хлорида. Объем растворителя определяют, исходя из заранее определенного количества живых клеток в таблетке, с таким расчетом, чтобы 1 мл вакцины содержал $1 \cdot 10^9$ живых м.к. Далее определение проводят в соответствии с методикой, изложенной в ФС «Вакцина чумная живая».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Хранение и транспортирование. При температуре от 2 до 8 °С.

Вакцина чумная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций	ФС.3.3.1.0022.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину чумную живую, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций, представляющую собой живую культуру вакцинного штамма чумного микроба *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ, высушенную методом лиофилизации в стабилизирующей среде.

Вакцина предназначена для профилактики чумы и вызывает развитие специфического иммунитета продолжительностью до 1 года.

ПРОИЗВОДСТВО

Вакцинный штамм *Y. pestis* EV линии НИИЭГ должен обладать типичными морфологическими, культуральными и биохимическими свойствами; содержать плазмиды pFra, пестициногенности (pPst) и кальций-зависимости (pCad) с молекулярными массами ≈ 60 , ≈ 6 и ≈ 47 MDa соответственно; не должен вызывать гибель морских свинок и потерю их массы при введении в дозе $15 \cdot 10^9$ микробных клеток (м.к.). Иммуногенность штамма по величине ED_{50} при подкожном введении не должна превышать для морских свинок 10^3 м.к., для белых мышей – 10^4 м.к.

Перед приготовлением очередной серии вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ проводят его пассаж через организм морской свинки с по-

следующим отбором типичных колоний, выросших на чашках Петри с агаром Хоттингера из посевов селезенки и регионарных лимфатических узлов.

Технология изготовления вакцины предусматривает получение посевных культур *Y. pestis* EV линии НИИЭГ I, II и III генераций; процесс накопления биомассы, выращенной для приготовления вакцинной взвеси с необходимой концентрацией; последующий розлив, замораживание, сублимационное высушивание, герметизацию и упаковку препарата. На стадиях приготовления посевных культур определяют pH, концентрацию микробных клеток и отсутствие посторонней микрофлоры.

В зависимости от технологии приготовления вакцины в процессе производства используются вспомогательные вещества, разрешенные для использования при производстве иммунобиологических лекарственных препаратов.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Пористая масса серовато-белого цвета.

Восстановленный препарат – гомогенная суспензия серовато-белого цвета без посторонних примесей и хлопьев. Определение проводят визуально.

Подлинность. Вакцина должна содержать чистую культуру вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ. Определение проводят иммунофлуоресцентным методом с помощью иммуноглобулинов чумных диагностических флуоресцирующих, в соответствии с инструкцией по применению. В мазках из препарата микробные клетки должны светиться по периферии ярко-зеленым цветом.

Время растворения. Должна полностью растворяться в течение 3 мин при добавлении 1,8 мл 0,9 % раствора натрия хлорида.

Время седиментационной устойчивости. Суспензия не должна расслаиваться в течение 5 мин. Определение проводят в соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

Проходимость через иглу. Гомогенная взвесь, диспергированная путем встряхивания, должна свободно проходить в шприц через иглу 0,8· 40, если нет иных указаний в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Суспензии».

pH. От 6,8 до 7,8. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия». Для испытания используют 5 образцов.

Потеря в массе при высушивании. Не более 4,0 %. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании». Для испытания используют 5 образцов.

Средняя масса и отклонение от средней массы. Коэффициент вариации массы вакцины в ампулах (флаконах) должен быть не более 5 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов. Вакцина не должна содержать посторонних микроорганизмов и грибов. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методом прямого посева на тиогликолевую среду.

В ампулу (флакон) с вакциной вносят 2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. По 1 мл каждого образца полученной взвеси засевают в пробирки, содержащие по 20 мл тиогликолевой среды. Одну пробирку из каждого образца инкубируют при температуре от 30 до 35 °С для выявления аэробных и анаэробных микроорганизмов, другую – при температуре от 20 до 25 °С для выявления грибов. Через 5 – 7 сут из каждой пробирки производят пересев по 0,5 мл в 2 пробирки, содержащие по 10 мл тиогликолевой среды, и инкубируют при указанных выше температурах. Через 14 сут выращивания со дня первичного посева из всех пробирок делают мазки, окрашивают их по Граму, просматривают под микроскопом при увеличении К7×40.

В случае обнаружения хотя бы в одном из 10 просмотренных полей зрения кокков или грамположительных палочек препарат считается контами-

нированным посторонней микрофлорой.

При выявлении в мазках грамотрицательных палочек, отличающихся по морфологии от чумного микроба, готовят мазки, которые окрашивают иммуноглобулинами чумными диагностическими флуоресцирующими в соответствии с инструкцией по применению и просматривают в каждом мазке не менее 10 полей с помощью люминесцентного микроскопа. Если не все бактерии, обнаруживаемые в вакцине, дают специфическое ярко-зеленое свечение по периферии клеток, препарат считают не выдержавшим испытание.

Специфическая безопасность. Вакцина должна быть безопасной. Испытание проводят на морской свинке массой (275 ± 25) г.

Содержимое ампулы (флакона) растворяют в 1,8 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, определяют концентрацию по методике, описанной в разделе «Специфическая активность (концентрация микробных клеток)», разводят 0,9 % раствором натрия хлорида до концентрации $15 \cdot 10^9$ м.к./мл и вводят подкожно в объеме 1 мл одной морской свинке во внутреннюю поверхность бедра.

На 6 сут морскую свинку взвешивают, подвергают эвтаназии, отмечают патологоанатомические изменения, обнаруживаемые при вскрытии. Печень, селезенку, легкие, регионарные лимфатические узлы, кровь и ткани из места введения высевают методом отпечатков на чашку Петри с агаром Хоттингера, pH (7,2 ± 0,1), с добавлением натрия сернистокислого 0,25 г на 1 л среды и на чашку Петри с агаром Хоттингера, pH (7,2 ± 0,1), с добавлением генцианвиолета 0,05 г на 1 л среды. Посевы инкубируют при температуре (27 ± 1) ^{o}C в течение 3 сут.

Вакцина не должна вызывать у морской свинки потерю массы к 6 сут после введения больше чем на 20 %, не должна вызывать видимых патологоанатомических изменений в легких – кровоизлияний, очагов воспаления, гранулем, абсцессов; в посевах крови и легких не должно быть роста чумного микроба. В месте введения допускается развитие кровоизлияния и инфиль-

трата подкожной клетчатки, переходящих в некроз. Во внутренних органах (селезенка и печень) допустимо развитие ограниченной узелковой реакции.

Специфическая активность

1. ***Концентрация микробных клеток.*** В препарате должно содержаться от $5 \cdot 10^{10}$ до 10^{11} м.к. в 1 мл. Определение проводят в 3 образцах для каждой серии. Колебания результатов определений в отдельных образцах не должны превышать 5 % от средней арифметической величины.

Содержимое ампулы (флакона) растворяют в 1,8 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. В стандартную пробирку вносят 0,1 мл разведенного препарата и добавляют 0,9 % раствор натрия хлорида до достижения концентрации стандартного образца (СО) мутности (10 МЕ). Объем 0,9 % раствора натрия хлорида, использованный при разведении, учитывают при расчете концентрации микробных клеток (ОК) по формуле:

$$ОК = (0{,}1 + n) \cdot 10 \quad (1)$$

где: 0,1 – объем растворенной вакцины, мл;
n – объем 0,9 % раствора натрия хлорида, использованный при разведении пробы, мл;
10 – постоянная величина.

2. ***Количество живых микробных клеток.*** Количество живых микробных клеток должно составлять не менее 25 % от общего количества микробных клеток. Колебания результатов определения в отдельных образцах не должны превышать 20 % от средней арифметической величины.

При определении количества живых микробных клеток в вакцине используют концевые химически чистые пипетки и пробирки с 0,9 % раствором натрия хлорида, которые должны быть охлаждены до температуры от 2 до 8 °С.

Для определения количества живых микробных клеток из приготовленных ранее образцов взвесей вакцины делают последовательные десятикратные разведения от 10^{-1} до 10^{-8}, используя для каждого разведения отдельную пипетку вместимостью 1 мл. Из пробирок с разведениями 10^{-7} и 10^{-8} высевают пипеткой по 0,1 мл взвеси на 2 чашки Петри с питательной средой

для выделения и культивирования чумного микроба или с агаром Хоттингера со стимулятором роста (кровь гемолизированная до 1 % концентрации) или натрий сернистокислый (0,25 г на 1 л среды).

Через 72 – 96 ч инкубации при температуре (27 ± 1) ^{o}C подсчитывают количество колоний для каждого образца, принимая за 100 % количество микробных клеток, высеянных, исходя из показателя общей концентрации микробных клеток для данного образца, определенной с помощью СО мутности (10 МЕ). За количество жизнеспособных микробных клеток для каждой серии принимают среднее арифметическое определений для 3 ампул (флаконов).

Исходя из количества жизнеспособных микробных клеток в ампуле (флаконе) с вакциной рассчитывают количество доз и объем растворителя каждой серии для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций.

Для достоверности полученных результатов параллельно используют стандартный образец вакцины чумной живой.

3. ***Иммуногенность.*** ED_{50} вакцины для морских свинок не должна превышать 10^4, для белых мышей – $4 \cdot 10^4$ живых микробных клеток. Испытание проводят на морских свинках массой (275 ± 25) г и на белых нелинейных мышах массой (19 ± 1) г. Вакцину разводят с таким расчетом, чтобы в 1 мл содержалось 10^9 живых м.к. Исходя из заранее определенного количества живых м.к., вакцину разводят для иммунизации морских свинок до концентраций $2 \cdot 10^5$; $4 \cdot 10^4$; $8 \cdot 10^3$ и $16 \cdot 10^2$ м.к./мл; белых мышей – до концентраций $5 \cdot 10^5$; $1 \cdot 10^5$; $2 \cdot 10^4$ и $4 \cdot 10^3$ м.к./мл. Каждую дозу препарата вводят однократно 6 животным. Морских свинок иммунизируют подкожно во внутреннюю поверхность левого бедра в объеме 0,5 мл; белых мышей – в объеме 0,2 мл дозами $8 \cdot 10^2$, $4 \cdot 10^3$, $2 \cdot 10^4$ и $1 \cdot 10^5$ живых м.к.

Для определения фактического содержания живых микробных клеток в иммунизирующих дозах взвесь, содержащую $8 \cdot 10^3$ м.к./мл, используемую при иммунизации морских свинок, или дозу $4 \cdot 10^3$ м.к./мл для иммунизации

белых мышей, разводят до концентрации 10^3 м.к./мл. По 0,1 мл взвеси с концентрацией 10^3 м.к./мл (100 м.к.) высевают на 3 чашки Петри с одной из вышеперечисленных питательных сред и инкубируют при температуре (27 ± 1) ^oC в течение 48 ч. Количество выросших колоний на чашках учитывают при вычислении ED_{50} испытуемой серии.

Подкожное заражение морских свинок проводят во внутреннюю поверхность правого бедра на 21 сут, мышей – в ту же область на 7 или 21 сут после иммунизации. Заражающая доза для иммунизированных вакциной животных составляет 200 Dcl (Dosis certa letalis = LD_{100}) вирулентного штамма чумного микроба, 1 Dcl которого не должна превышать 100 микробных клеток.

Подготовка заражающего штамма *Y. pestis* 231 должна быть указана в нормативной документации.

Для заражения неиммунизированных (контрольных) животных используют взвесь с концентрацией 50 м.к./мл в объеме 0,5 мл для морских свинок и 125 м.к./мл в объеме 0,2 мл для белых мышей, что соответствует 1 Dcl.

Для определения фактического содержания микробных клеток заражающего штамма по 0,1 мл взвеси культуры *Y. pestis* 231, содержащей 10^3 м.к./мл, высевают на 3 чашки Петри с агаром Хоттингера и равномерно распределяют по всей поверхности среды методом «обкатки» чашек. Посевы инкубируют при температуре (27 ± 1) ºС в течение 48 ч, после чего подсчитывают количество выросших колоний.

Наблюдение за зараженными животными ведут в течение 20 сут. Все контрольные животные должны погибнуть от чумы в течение 10 сут. Погибших животных вскрывают, берут органы и ткани (у морских свинок берут пробы из места введения, регионарных паховых лимфатических узлов, печени, селезенки, легких, верхушки сердца; у белых мышей – из селезенки), высевая их методом отпечатков на чашки Петри с агаром Хоттингера с добавлением генцианвиолета и с агаром Хоттингера - с натрием сернистокислым.

Чашки Петри инкубируют при температуре (27 ± 1) ºС. Учет результатов проводят через 24 – 48 ч.

Павшими от чумы считают только тех животных, из органов которых при высеве выделяется культура *Y. pestis.*

ED_{50} вычисляют по формуле:

$$\lg ED_{50} = \lg D_N - S \cdot (\Sigma L_i - 0{,}5) \quad (2)$$

где: $\lg D_N$ – логарифм максимальной иммунизирующей (фактической) дозы;

S – логарифм кратности разведений;

L_i – отношение количества животных, выживших при иммунизации данной дозой, к общему количеству животных, которым эта доза была введена;

$\sum L_i$ – сумма значений L_i, найденных для всех испытанных доз.

Если все контрольные животные выжили или значение ED_{50} будет более допустимого, контроль повторяют на таком же количестве животных. Если при повторном испытании значение ED_{50} будет выше допустимого, препарат считают не выдержавшим испытание.

Термостабильность. Не менее 4 сут. Показатель термостабильности (срок, в течение которого в препарате сохраняется 50 % живых микробных клеток по отношению к первоначальному количеству) определяют в 3-х образцах после хранения вакцины при температуре (37 ± 1) ºС в течение 14 сут.

Методика определения количества живых микробных клеток изложена в разделе «Специфическая активность». Показатель термостабильности (t) в сут вычисляют по формуле:

$$t = \frac{0{,}3 \cdot 14}{\lg A_0 - \lg A_n} \quad (3)$$

где: $\lg A_0$ – логарифм первоначального количества живых м.к./мл;

$\lg A_n$ – логарифм количества живых м.к./мл через 14 сут хранения вакцины при температуре (37 ± 1) °С;

0,3 – постоянная величина;

14 – срок хранения вакцины при температуре (37 ± 1) °С, сут.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С.

Туберкулин очищенный (ППД) ФС.3.3.1.0023.15
(аллерген туберкулезный очищенный)

Настоящая фармакопейная статья распространяется на туберкулин очищенный (ППД) (аллерген туберкулезный очищенный): туберкулин очищенный в стандартном разведении (2 ТЕ в 0,1 мл), и туберкулин очищенный, лиофилизат (в ампуле 50000 ТЕ). Туберкулин очищенный (ППД) представляет собой очищенный туберкулопротеин ППД (PPD – *purified protein derivative*), полученный из инактивированных нагреванием фильтратов культур микобактерий туберкулеза (МБТ) человеческого и бычьего типов, очищенных ультрафильтрацией или другим адекватным методом, с последующим осаждением трихлоруксусной кислотой (ТХУ). Очищенный туберкулин выявляет наличие гиперчувствительности замедленного типа, которая является следствием сенсибилизации организма при вакцинации БЦЖ или заражении микобактериями туберкулеза. Препарат предназначен для диагностики туберкулеза, определения инфицированности населения микобактериями туберкулеза и отбора контингентов для вакцинации и ревакцинации против туберкулеза.

ПРОИЗВОДСТВО

Работа с микобактериями должна проводиться в помещениях, оборудованных автономной приточно-вытяжной вентиляцией, изолированных от помещений, где наличие микобактерий не допускается. Производственные штаммы. Для приготовления применяют туберкулиногенные штаммы микобактерий туберкулеза *M. tuberculosis Dt/Strain*, и/или Т-3480 и *M. bovis*

“Vallee” из Государственной коллекции ПБА. Используют не более 2 пассажей на плотной питательной среде для выращивания микобактерий, не более 2 пассажей на жидкой картофельной среде и не более 8 пассажей на синтетической среде Линниковой-Могилевского.

Питательные среды перед посевом микобактерий должны быть проверены на стерильность. Выросшие на поверхности жидкой синтетической среды в виде складчатых пленок культуры микобактерий инактивируют автоклавированием при температуре 121 °С в течение не менее 30 мин или текучим паром при температуре 100 °С в течение 1 ч, фильтруют и концентрируют ультрафильтрацией.

Осаждение туберкулопротеина проводят 50 % раствором ТХУ; осадок отмывают убывающими концентрациями ТХУ, обрабатывают спиртом и эфиром, сушат, проверяют на стерильность и подлинность. После получения положительных результатов сводят в единую серию порошка-полуфабриката (субстанцию). Последующее сведение таких серий в единую серию субстанции является одним из методов получения стандартного препарата длительного срока хранения (20 и более лет). Субстанцию используют для производства туберкулина очищенного в стандартном разведении (2 ТЕ в 0,1 мл), предназначенного для массовой туберкулинодиагностики, и туберкулина очищенного, лиофилизата, предназначенного для индивидуальной туберкулинодиагностики (в ампуле 50000 ТЕ).

Предварительно серию субстанции тестируют на стерильность, отсутствие сенсибилизирующих свойств, специфическую безопасность (отсутствие живых микобактерий туберкулеза), специфическую активность – определение дозы-навески, содержащей 50000 ТЕ. Специфическую активность туберкулинов выражают в туберкулиновых единицах (ТЕ), эквивалентных международным туберкулиновым единицам (TU) для больных туберкулезом.

Емкость со смесью порошков (субстанцией) хранят в эксикаторе в темном сухом месте. Каждые 5 лет субстанция подлежит повторному испытанию на стерильность и специфическую активность на животных (подтвер-

ждение дозы-навески).

ИСПЫТАНИЯ СУБСТАНЦИИ

Стерильность. Субстанция должна быть стерильной. Субстанцию растворяют в 0,9 % растворе натрия хлорида из расчета 1 мг в 1 мл. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Содержание белка. Должно быть не ниже 75 %. Определение проводят колориметрическим методом в соответствии с ОФС «Определение общего азота с реактивом Несслера в биологических лекарственных препаратах».

Специфическая активность

Установление дозы-навески субстанции ППД, содержащей 50000 ТЕ. Определение проводят на 18 сенсибилизированных морских свинках путем сопоставления активности разведений навесок порошка-полуфабриката (субстанции) с активностью стандартного образца (СО) ППД (СО специфической биологической активности очищенного туберкулина). Сенсибилизируют животных внутрикожным введением в область живота (в 2 – 4 места) вакцины БЦЖ или убитых нагреванием микобактерий туберкулеза в неполном адъюванте Фрейнда (0,5 – 1 мг микобактерий на 1 животное).

Три навески исследуемой субстанции ППД, массой не менее 50 мг каждая, растворяют в фосфатном буферном растворе, pH (7,4 ± 0,05) таким образом, чтобы в 1 мл субстанции ППД содержалось на 20 % ниже и выше дозы навески СО ППД (получают 3 основных раствора). Сравнивают специфическую активность основного раствора с СО ППД, проводя испытание на 6 сенсибилизированных морских свинках. Для этого из основного раствора готовят разведения 1:40; 1:200 и 1:1000 и титруют относительно 5; 25 и 125 ТЕ СО, вводя внутрикожно по 0,1 мл каждого разведения сенсибилизированным морским свинкам в группе по методу случайной выборки (например, метод латинских квадратов). Ответные реакции учитывают через 24 ч. Статистический анализ основан на том, что зависимость lg «доза – эффект» имеет линейный характер. Вычисляют средний угол наклона линий и подсчиты-

вают логарифм относительной активности (lg R) – расстояние между параллельными линиями зависимости доза – эффект. Относительная активность (R) должна быть равна (1,0 ± 0,2) при доверительных границах в пределах от 75 до 130 % (P = 0,95). За доверительные границы принимают ± 2 стандартные ошибки логарифма относительной активности. Если бóльшая испытуемая навеска имеет по сравнению с СО ППД меньшую величину, следует увеличить навески и провести титрование. Если на меньшую навеску реакции будут с большей величиной, по сравнению с СО ППД, то следует провести титрование, используя уменьшенные навески порошка испытуемой субстанции.

Специфическая безвредность. Отсутствие живых микобактерий туберкулеза определяют на морских свинках, содержащихся в условиях, исключающих их контаминацию живыми микобактериями туберкулеза. Раствор субстанции, содержащей 50000 ТЕ/мл в фосфатном буфере без консерванта и стабилизатора, в объеме 10 мл центрифугируют при 3000 об/мин в течение 30 мин. Верхний слой надосадочной жидкости (около 8 мл) удаляют, осадок ресуспендируют и вводят внутрибрюшинно по 1 мл 2 морским свинкам массой 250 – 300 г, за которыми наблюдают 42 сут. Животные должны оставаться здоровыми. Через 42 сут морских свинок вскрывают и проводят макроскопическое, гистологическое и бактериологическое исследование внутренних органов (селезенки, легких, печени и лимфатических узлов). При макроскопическом и микроскопическом исследовании не должно быть обнаружено патологических признаков, характерных для туберкулезной инфекции. Для бактериологического (культурального) исследования тщательно гомогенизируют лимфатические узлы (все вместе), селезенку, ¼ часть печени и одно легкое. Гомогенизаты обрабатывают в течение 10 мин 5 % раствором серной кислоты, центрифугируют при 3000 об/мин в течение 15 мин, ресуспендируют в 0,9 % растворе натрия хлорида и засевают на яичную среду Левенштейна-Йенсена (не менее 5 пробирок для каждого органа). Посевы выдерживают в течение 45 сут при температуре 37 °С. Рост колоний микобак-

терий на поверхности среды должен отсутствовать.

Сенсибилизирующие свойства. Должны отсутствовать. Морским свинкам (3 особи) массой 300 – 350 г вводят внутрикожно трехкратно с интервалом 5 сут по 125 ТЕ в 0,1 мл разведения субстанции. Спустя 15 сут этим и 3 интактным морским свинкам вводят внутрикожно по 500 ТЕ в 0,1 мл испытуемой субстанции. Разведения 125 и 500 ТЕ готовят из основного раствора субстанции, используя 0,9 % раствор натрия хлорида. Ответную реакцию учитывают через 24 ч, измеряя 2 взаимно перпендикулярных диаметра эритемы. Реакции у первых 3 морских свинок не должны отличаться от реакций у контрольных животных ($p > 05$). Животных содержат в условиях, исключающих контаминацию микобактериями.

ИСПЫТАНИЕ ТУБЕРКУЛИНА

Описание. Туберкулин очищенный в стандартном разведении – бесцветная прозрачная жидкость без посторонних включений.

Туберкулин очищенный (лиофилизат) – пористая масса или аморфный порошок серовато-белого или кремового цвета, который для проведения испытаний разводят в 1 мл прилагаемого растворителя.

Подлинность. Вызывает при внутрикожном введении морским свинкам, сенсибилизированным вакциной БЦЖ, 12 – 16-суточной культурой БЦЖ или убитыми *Mycobacterium tuberculosis*, положительные реакции (как описано в разделе «Специфическая активность»).

Прозрачность. Должен быть прозрачными. Определение проводят визуально в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Цветность. Должен быть бесцветным. Определение проводят визуально в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

pH. Туберкулин очищенный в стандартном разведении: от 7,35 до 7,45; туберкулин очищенный (лиофилизат): от 6,95 до 7,75. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Стерильность. Должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методом прямого посева или мембранной фильтрации.

Аномальная токсичность. Должен быть нетоксичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Вводят внутрибрюшинно 5 белым мышам массой 17 – 20 г тест-дозу в объеме 0,5 мл; покожно 2 морским свинкам массой 250 – 300 г тест-дозу в объеме 1 мл. Период наблюдения за животными составляет 7 сут.

Специфическая активность. 1. Индекс специфической активности (I) туберкулина очищенного в стандартном разведении (отношение суммы реакций на испытуемый препарат к сумме реакций на СО ППД должен находиться в пределах от 0,95 до 1,05 при отсутствии достоверных различий между средними реакциями на стандартный и испытуемый образцы. Испытание проводят на 6 морских свинках, белокожих или альбиносах, массой (350 ± 50) г, сенсибилизированных, как описано выше, для определения дозы-навески субстанции. На каждом боку ставят по 4 пробы (отдельными шприцами) с 2 ТЕ в 0,1 мл испытуемой серии и 2 ТЕ СО ППД, чередуя предварительно закодированные по методу случайной выборки 8 шприцев с препаратами. Реакции регистрируют через 24 ч.

2. Относительная активность (R) туберкулина очищенного, лиофилизата, должна быть равна (1,0 ± 0,2) при доверительных границах в пределах от 75 до 130 % (P = 0,95). Из основного разведения испытуемой серии, содержащего 50000 ТЕ в 1 мл (в ампулу добавляют 1 мл прилагаемого растворителя), готовят 3 разведения: 5; 25 и 125 ТЕ в 0,1 мл, используя для этой цели 0,9 % раствор натрия хлорида. Определение проводят по разделу «Специфическая активность – определение дозы навески субстанции», используя разведения, содержащие 5; 25 и 125 ТЕ в 0,1 мл СО ППД.

Если результат испытания выходит за допустимые пределы, испытание повторяют. Результаты первого и повторного испытаний усредняют.

Упаковка и **маркировка**. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты». На упаковке очищенного туберкулина, лиофилизата, должна быть надпись: «Только для специализированных медицинских учреждений».

Транспортирование и **хранение**. При температуре от 2 до 8 ^{o}C в условиях, исключающих замораживание.

Вакцина против краснухи культуральная живая, лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения

ФС.3.3.1.0024.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину против краснухи культуральную живую, лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения, представляющую собой препарат, содержащий аттенуированный вакцинный штамм вируса краснухи RA 27/3, выращенный на диплоидных клетках человека MRC-5.

Вакцина предназначена для плановой профилактики краснухи.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство вакцины против краснухи культуральной живой должно осуществляться с соблюдением установленных требований к правилам надлежащей организации производства и контроля качества лекарственных препаратов на всех этапах производства, в основе которого заложена система посевных вирусов.

В качестве субстрата для накопления вируса используют диплоидные клетки человека MRC-5.

Производство вакцины должно обеспечивать стабильность показателей качества готового продукта. Качество исходного сырья и материалов, используемых в производстве, должно быть подтверждено соответствующими

документами.

Состав вакцины. Одна прививочная доза препарата (0,5 мл) содержит:

– активный компонент: вирус краснухи – не менее 1000 (3,0 lg) тканевых цитопатогенных доз ($ТЦД_{50}$);

– вспомогательные вещества: стабилизатор, состав и количество которого указывают в нормативной документации.

Производственный штамм – вируссодержащая жидкость, приготовленная путем пассирования вакцинного штамма вируса краснухи в производственном клеточном субстрате. Производственный штамм должен быть идентифицирован с помощью документов, которые должны включать сведения о происхождении штамма, методе аттенуации и уровне пассажа, на котором аттенуация была подтверждена результатами клинических испытаний. С помощью соответствующих лабораторных методов и клинических испытаний на восприимчивых к краснухе людях должно быть доказано, что штамм вируса краснухи, используемый в производстве вакцины, безопасен и иммуногенен.

Производственный штамм вируса краснухи готовят из вакцинного штамма RA 27/3. Штамм депонирован в официальной Государственной коллекции вирусов.

Производственный штамм должен отвечать следующим требованиям: быть специфичным; обладать генетической стабильностью; иметь специфическую активность не ниже 4, 0 lg $ТЦД_{50}$/0,5мл; быть стерильным: не содержать бактерий, грибов, микоплазм, микобактерий туберкулеза и посторонних вирусов; должен обладать репродуктивной активностью: вызывать специфическую дегенерацию в чувствительных культурах клеток, сопровождающуюся накоплением вируса в питательной среде; не обладать аномальной токсичностью; не обладать остаточной нейровирулентностью при интрацеребральном введении обезьянам; не быть контагиозным; потеря в массе при высушивании должна быть не более 2,0 %; должен храниться в лиофилизирован-

ном виде при температуре минус (60±10) °С;

По указанным показателям должна быть проверена каждая новая серия производственного штамма.

Производственный штамм в процессе хранения должен быть проверен на генетическую стабильность (не реже 1 раза в 5 лет).

Примечание

Испытание на присутствие микоплазм производственного штамма, посевного вируса, производственного и рабочих банков клеточной культуры, сыворотки крупного рогатого скота должно проводиться двумя методами: цитохимическим и микробиологическим. Испытание на присутствие микоплазм вирусных сборов, полуфабриката вакцины и готового продукта следует проводить микробиологическим методом.

Посевной вирус – вируссодержащая жидкость, полученная путем одного - двух пассажей производственного штамма на производственном субстрате; служит в качестве посевного материала для изготовления вакцины. Посевной вирус должен обладать теми же характеристиками, что и производственный штамм, из которого он получен. Каждая серия посевного вируса должна быть идентифицирована как вирус краснухи с помощью соответствующих методов.

Каждая серия посевного вируса должна быть проверена на остаточную нейровирулентность, что определяют в тесте на обезьянах по ОФС «Оценка специфической безопасности производственных штаммов и посевных вирусов кори, паротита и краснухи».

Требования к специфической безопасности вакцины касаются не только отсутствия остаточной нейровирулентности, но также и наличия генетической стабильности производственного штамма и посевных серий. Следует оценивать генетическую стабильность новых посевных серий вируса краснухи так же, как и новых серий производственного штамма. Сравнительный анализ секвенированных последовательностей генома вируса в указанных

производственных материалах должен подтвердить их идентичность структуре вакцинного штамма.

Методы культивирования должны обеспечивать сохранение иммуногенных свойств готового препарата, его безопасность и предотвращать контаминацию посторонними вирусами, бактериями, грибами и микоплазмами.

Пассажный уровень вируса в готовом препарате должен быть ограничен. Допускается пассирование производственного штамма и посевных вирусов в производственном субстрате с таким расчетом, чтобы готовая вакцина содержала вирус на том уровне пассажа, на котором ее безопасность и эффективность были подтверждены результатами клинических испытаний.

Особое внимание уделяют обеспечению стабильности таких параметров, как множественность заражения и условия культивирования (продолжительность и температура инкубации).

Рекомендуется хранить большой объем посевной серии в качестве материала для производства коммерческих серий вакцины. Серии посевного вируса в лиофилизированном виде следует хранить при температуре ниже минус 20 °С, а в нелиофилизированном виде – при температуре ниже минус 60 °С.

Клеточный субстрат, используемый для производства

Субстратом для размножения и накопления вируса краснухи являются диплоидные клетки человека MRC-5. Для производства вакцины предприятие должно использовать культуры диплоидных клеток человека, выращенные из аттестованного надлежащим образом банка рабочих клеток в соответствии с международными и национальными требованиями и требованиями ОФС «Требования к клеточным культурам – субстратам производства иммунобиологических лекарственных препаратов».

Посевные клетки и банк рабочих клеток должны быть охарактеризованы с точки зрения генеалогии, ростовых свойств, генетических маркеров, жизнеспособности во время хранения. С помощью соответствующих тестов

должно быть подтверждено, что клетки не содержат бактерий, грибов, микоплазм, а также гемадсорбирующих, гемагглютинирующих и других вирусов. Также должно быть доказано, что клетки диплоидны и стабильны.

Все работы с банком клеток и последующими клеточными культурами проводят в асептических условиях в зоне, в которой одновременно не проводится работа с другими клетками.

Питательная среда для клеток может содержать pH индикатор, например, феноловый красный.

При культивировании клеток не допускается использование нативной сыворотки крови человека, а также пенициллина и стрептомицина.

Материалы от животных, которые используют при производстве вакцины, получают от животных из хозяйств, благополучных в отношении бактериальных, вирусных, прионовых и других заболеваний, опасных для человека. Сыворотка крови крупного рогатого скота должна быть получена от животных из стада, в котором отсутствуют такие заболевания, как спонгиформная энцефалопатия и лейкоз крупного рогатого скота. Трипсин, используемый для приготовления клеточной культуры, не должен содержать микоплазм, цирко- и парвовирусов свиней, также должен быть испытан на отсутствие контаминации бактериями и грибами.

Вещества, вносимые в препарат. К веществам, вносимым в препарат, относят сыворотку крови плодов коровы или эмбриональную телячью сыворотку, или фетальную сыворотку, которая используется для выращивания клеточной культуры. Сыворотка должна быть испытана на отсутствие контаминации вирусами, бактериями, грибами, микоплазмами.

Сыворотка крови животных должна быть удалена после инокуляции культур посевным вирусом. Перед сбором вируса культуру клеток отмывают, и ростовую среду заменяют бессывороточной поддерживающей средой. Наличие остаточного количества бычьего сывороточного альбумина (БСА) не должно превышать 50 нг в одной прививочной дозе (0,5 мл). Определение

проводят подходящим иммунохимическим методом. Количество БСА не должно превышать 50 нг в одной прививочной дозе. Определение проводят иммунохимическим методом на образце готовой серии.

Испытания на этапах производства

В процессе производства вакцины против краснухи культуральной живой на всех этапах производства проводят исследования основных показателей качества. В процессе масштабирования клеточной культуры MRC-5 проводят контроль стерильности, ростовой среды, качество монослоя. Проводят исследование на присутствие контаминантов в культуральной жидкости, собранной с культур контрольных клеток, в образцах вируссодержащей жидкости. Индивидуальные вирусные сборы проверяют на стерильность и специфическую активность. Объединенные вирусные сборы проверяют на стерильность, присутствие микоплазм, микобактерий, посторонних вирусов, специфическую активность. Осветленный вирусный пул контролируют на стерильность, интактные клетки, БСА. В жидком полуфабрикате контролируют специфическую активность, стерильность».

В готовом жидком полуфабрикате контролируют содержание БСА, специфическую активность, стерильность, присутствие микоплазм.

При производстве вакцины особое значение имеет постоянное выполнение на всех этапах производства внутрипроизводственного анализа основных показателей качества и анализа качества готового продукта при выпуске.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Лиофилизат - однородная пористая масса. Цвет лиофилизата указывают в нормативной документации. Определение проводят визуально.

Восстановленный препарат – прозрачная жидкость. Цветность восстановленного препарата указывают в нормативной документации. Определение проводят визуально.

Подлинность. Препарат должен содержать вирус краснухи. Определе-

ние проводят в реакции нейтрализации на культуре клеток RK-13. Подлинность вируса краснухи в вакцине устанавливают на основании нейтрализации цитопатогенного действия (ЦПД) вируса краснухи специфической иммунной сывороткой, используя аттестованный стандартный образец антител против вируса краснухи.

Время растворения. Препарат должен растворяться в течение 3 мин при внесении в ампулу воды для инъекций из расчета 0,5 мл на одну дозу. Определение проводят визуально.

Механические включения. Восстановленный препарат должен соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и в глазных лекарственных формах».

pH (восстановленного препарата**).** От 7,0 до 8,0, если нет других указаний в нормативной документации. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Потеря в массе при высушивании. Не более 2,0 %. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС **«**Потеря в массе при высушивании».

Бычий сывороточный альбумин. Не более 50 нг в одной прививочной дозе. Определение проводят подходящим количественным иммунохимическим методом, указанным в нормативной документации.

Стерильность. Препарат не должен содержать бактерий и грибов**.** Определение проводят методом прямого посева или мембранной фильтрации с использованием одной тиогликолевой среды при двух температурных режимах в соответствии с ОФС « Стерильность».

Присутствие микоплазм. Препарат не должен содержать микоплазм**.** Определение проводят микробиологическим методом в соответствии с ОФС «Испытание на присутствие микоплазм». Если при испытаниях сырья и материалов при входном контроле и на всех контрольных точках в технологи-

ческом процессе контаминация микоплазмами надлежащими методами не обнаружена, то испытание готовой серии вакцины на присутствие микоплазм может не проводиться.

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичным. Определение проводят биологическим методом на белых мышах и на морских свинках обоего пола в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Животным вводят по одной прививочной дозе препарата в объеме 0,5 мл внутрибрюшинно, если нет других указаний в нормативной документации.

Специфическая активность. Прививочная доза (0,5 мл) должна содержать не менее 1000 (3,0 lg) $ТЦД_{50}$ вируса краснухи. Титр вируса определяют в каждой из 5 ампул серии готового продукта раздельно по ЦПД вируса на культуре клеток RK-13. Каждый образец вакцины должен иметь специфическую активность не ниже регламентированной, в противном случае проводят повторный контроль специфической активности дополнительных 5 образцов, результат которого считают окончательным. Минимально регламентированное содержание вируса в прививочной дозе должно сохраняться в течение всего срока годности.

Одновременно с определением титра вируса в образцах серии проводят титрование стандартного образца (СО) активности вируса краснухи. Одну ампулу стандартного образца титруют три раза для подтверждения достоверности каждого количественного определения активности.

Учет результатов проводят по ЦПД с помощью инвертированного микроскопа (увеличение: объектив 10× – окуляр 10×) в сроки, указанные в нормативной документации.

Наибольшее разведение вакцины, вызывающее ЦПД в 50 % лунок с зараженной клеточной культурой, принимают за титр вируса. Титр вируса в вакцине рассчитывают по методу Рида и Менча или Спирмена-Кербера.

При титровании вакцины в лунки планшетов вносят по 0,1 мл каждого разведения вакцины, т.е. объем, в 5 раз меньший, чем объем прививочной до-

зы. Для расчета активности вируса в прививочной дозе к титру вируса, рассчитанному в lg $ТЦД_{50}$/0,1мл, добавляют постоянную величину, равную lg 5, т.е. 0,7.

Критерии приемлемости результатов:

– диапазон доверительного интервала (P=0,95) среднего значения титра СО, определенного при трехкратном титровании 1 ампулы, должен быть в пределах ± 0,3 lg $ТЦД_{50}$;
— титр вируса в СО не должен отличаться более, чем на 0,5 lg $ТЦД_{50}$ от аттестационного значения.

Термостабильность. Препарат должен быть термостабильным. Испытание проводят, определяя специфическую активность при одновременном титровании 5 образцов вакцины, инкубированных при температуре (37 ± 1) °С в течение 7 сут, и 5 образцов вакцины, хранившихся при температуре от 2 до 8 °С. Препарат считают прошедшим испытание, если средняя геометрическая величина титра вируса в образцах после прогревания снижается не более, чем на 1 lg.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Дополнительная информация: субстрат культивирования вируса и предупредительные надписи: «Хранить при температуре от 2 до 8 °С в недоступном для детей месте», «Избегать контакта вакцины с дезинфицирующими средствами».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С.

Вакцина антирабическая культуральная концентрированная очищенная инактивированная **ФС.3.3.1.0025.15**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину антирабическую культуральную концентрированную очищенную инактивированную, которая представляет собой лиофилизированный препарат, содержащий производственный штамм «Внуково-32» фиксированного вируса бешенства, выращенный в первичной культуре клеток почек сирийских хомячков, концентрированный, очищенный и инактивированный УФ-излучением или УФ-излучением в сочетании с обработкой формальдегидом.

Одна прививочная доза вакцины должна содержать вируса бешенства антиген специфический инактивированный, имеющий специфическую активность не менее 2,5 Международных Единиц (МЕ).

Вакцина не содержит консервантов и антибиотиков.

Вакцину выпускается в комплекте с растворителем.

Вакцина антирабическая культуральная концентрированная очищенная инактивированная предназначена для профилактики бешенства.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство вакцины для профилактики бешенства должно быть основано на системе посевных материалов (seed lot system), включающей главный посевной материал и рабочий посевной материал производственного штамма «Внуково-32» фиксированного вируса бешенства.

Количество пассажей полностью охарактеризованного главного посевного вирусного материала для получения рабочего посевного вирусного материала, используемого для производства вакцины, не должно превышать 5.

Рабочий посевной вирусный материал должен отвечать следующим требованиям:

Подлинность. Производственный штамм вируса бешенства должен нейтрализоваться иммуноглобулином антирабическим из сыворотки крови лошади и не должен нейтрализоваться сывороткой крови крупного рогатого скота нормальной. Индекс нейтрализации – не менее 100.

Для испытания параллельно готовят 2 ряда разведений вируса в диапазоне (1:5) – (1:50000) с кратностью разведения 10. В качестве среды разведения используют 2 % раствор сыворотки крови лошади нормальной, приготовленный с применением стерильной воды очищенной или воды для инъекций. Сыворотку крови лошади нормальную предварительно инактивируют при температуре 56 ^{o}C в течение 30 мин. Для получения разведений вируса в первую пробирку каждого ряда, соответствующую разведению 1:5, вносят 0,4 мл среды разведения, в остальные пробирки ряда– по 0,45 мл среды разведения. В первую пробирку каждого ряда добавляют по 0,1 мл восстановленной суспензии вируса бешенства штамм «Внуково-32» и тщательно перемешивают содержимое пробирок. Далее готовят ряд последовательных разведений путем переноса 0,05 мл смеси из предыдущей пробирки в следующую пробирку, каждый раз используя новую пипетку. Из последней пробирки, соответствующей разведению 1:50000, удаляют 0,05 мл смеси. В результате конечный объем содержимого каждой пробирки составит 0,45 мл смеси.

В каждую пробирку первого ряда вносят по 0,45 мл иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади, в каждую пробирку второго ряда –по 0,45 мл сыворотки крови крупного рогатого скота нормальной, инактивированной при температуре 56 °С в течение 30 мин. В результате получают 2 ряда разведений вируса бешенства штамм «Внуково-32» в диапазоне от 10^{-1} до 10^{-5}. Содержимое пробирок осторожно перемешивают путем

встряхивания и инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (75 ± 15) мин. Затем пробирки быстро охлаждают на льду до комнатной температуры и каждым разведением вируса бешенства в объеме 0,03 мл интрацеребрально заражают по 6 беспородных мышей массой 9–10 г. За животными наблюдают 14 дней. Мышей, павших в течение первых 4 дней, при расчетах не учитывают. Титр вируса, использованного для заражения каждой из 2 групп мышей, вычисляют по методу Рида и Менча. Индекс нейтрализации рассчитывают путем вычитания логарифма обратного разведения, соответствующего LD_{50} вируса в смеси с иммуноглобулином антирабическим из сыворотки крови лошади, из логарифма обратного разведения, соответствующего LD_{50} вируса в смеси с сывороткой крупного рогатого скота нормальной. Если полученная разница превышает 2, то индекс нейтрализации больше 100.

Стерильность. Не должен содержать бактерий, в том числе микобактерий туберкулеза, и грибов. Испытание на отсутствие бактерий и грибов проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Испытание на отсутствие микобактерий туберкулеза проводят путем посева на среду Левенштейна-Йенсена.

Присутствие микоплазм. Не должен содержать микоплазм**.** Испытание проводят микробиологическим методом в соответствии с ОФС «Испытание на присутствие микоплазм».

Посторонние вирусные агенты. Не должен содержать посторонних вирусных агентов по результатам испытания: на 20 мышах-сосунках, на 20 беспородных белых мышах массой 15–20 г, на 5 морских свинках массой 350 – 500 г, на культурах клеток.

Используют здоровых животных, на которых ранее не проводили какие-либо испытания. Мышам-сосункам вводят по 0,01 мл испытуемого образца интрацеребрально и по 0,1 мл интраперитонеально, период наблюдения – 14 сут. Беспородным белым мышам вводят по 0,03 мл испытуемого образца интрацеребрально и по 0,5 мл интраперитонеально, период наблюдения – 28

сут. Морским свинкам вводят по 0,1 мл испытуемого образца интрацеребрально и по 5 мл интраперитонеально, период наблюдения – 42 сут.

Инфекционный титр вируса. Не менее 10^{-6} LD_{50}/мл при интрацеребральном заражении новорожденных беспородных белых мышей массой 6–8 г.

Специфическая активность. Не менее 1,0 МЕ. Определение проводят методом NIH (раздел «Испытания готового продукта»).

Испытания культур клеток

Для производства вакцины используют первичную культуру клеток почек сирийских хомячков. Почки для получения культуры клеток забирают у клинически здоровых хомячков.

При работе с культурами клеток запрещается использовать антибиотики группы пенициллинов.

Необходимо проводить испытания производственной культуры клеток на стерильность и на отсутствие посторонних вирусных агентов путем изучения феномена гемадсорбции и цитопатических изменений на чувствительных тест-системах: культуре клеток, используемой для производства вакцины, культуре клеточной линии из другого источника, культуре диплоидных клеток человека.

При наличии гемадсорбции и (или) цитопатических изменений в контрольных культурах опыт следует повторить в клеточной культуре другой партии.

Если при повторном исследовании контрольных клеточных культур в одном из испытаний обнаружены цитопатические изменения или феномен гемадсорбции, то вирус, полученный в соответствующих зараженных культурах, не должен быть использован для производства вакцины.

Все вещества животного происхождения, используемые для получения производственной культуры клеток и культивирования вируса бешенства, проверяют на отсутствие бактерий, грибов, микоплазм и посторонних вирус-

ных агентов. Для размножений клеток не следует применять сыворотки человеческого происхождения.

Производство полуфабриката (субстанции)

Все этапы производства должны быть валидированы.

Методы концентрации и очистки вируссодержащей жидкости указывают в нормативной документации. Допускается концентрация и очистка методом ультрафильтрации или концентрация методом ультрафильтрации с последующей очисткой методом гель-хроматографии.

Инактивацию проводят сразу после этапа очистки. При использовании физического метода инактивации отрабатывают режим инактивации: скорость подачи вируссодержащей жидкости, частоту вращения диска инактиватора, интенсивность излучения.

Вспомогательные вещества

Запрещается использовать в производстве антибиотики после технологического этапа сбора вируссодержащей культуральной жидкости.

В качестве стабилизаторов используют разрешенные вещества, указанные в нормативной документации.

Испытание на стерильность проводят на стадии получения объединенного полуфабриката после этапа концентрации и очистки (до инактивации), после этапа инактивации, после добавления в вакцину стабилизаторов (испытывают смесь для лиофилизации), в процессе розлива.

Испытание на отсутствие микоплазм проводят на стадии получения объединенного полуфабриката после этапа концентрации и очистки (до инактивации), после этапа инактивации.

При использовании дополнительного метода инактивации формальдегидом в полуфабрикате определяют остаточное количество формальдегида. Содержание формальдегида в полуфабрикате – не более 60 мкг/мл.

Испытание на содержание общего белка проводят до добавления стабилизаторов – сахарозы и желатина. Содержание общего белка в полуфабри-

кате должно быть от 4,7 до 5,0 мг/мл. Определение проводят методом Лоури в соответствии с ОФС «Определение белка».

По показателю «Герметичность» испытывают все ампулы серии. Для проведения испытания ампулы помещают в кассеты, заполненные водой, подкрашенной любым водно-растворимым красителем. Кассеты погружают таким образом, чтобы ампулы полностью находились в воде. Емкость герметично закрывают и создают в ней избыточное давление, по сравнению с атмосферным, – (100 ± 20) кПа. Давление выдерживают не менее 15 мин, после чего устанавливают в емкости давление, равное атмосферному. Емкость открывают, кассеты с ампулами вынимают и просматривают на наличие в них подкрашенной воды. Ампулы, содержащие подкрашенную воду, считают не выдержавшими испытание.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Пористая масса белого цвета, гигроскопична. Определяют визуально.

Подлинность. Вакцина должна вызывать специфический иммунитет к вирусу бешенства при иммунизации мышей. Испытание проводят одновременно с испытанием специфической активности. Определение проводят по разделу «Специфическая активность».

Время растворения. Должна полностью растворяться в течение 5 мин при внесении 1 мл растворителя (вода для инъекций) на 1 дозу вакцины. Определение проводят визуально.

Прозрачность. Прозрачная или слабо-опалесцирующая жидкость, не более эталона I. Определение проводят визуально в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Степень окраски жидкостей. Не более эталона Y_4. Определение проводят визуально в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекар-

ственных формах».

pH раствора. От 7,2 до 7,8. Определяют потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Потеря в массе при высушивании. Не более 2,0 %. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Альбумин бычий сывороточный (БСА). Не более 0,5 мкг в 1 дозе. Определяют методом ракетного иммуноэлектрофореза в соответствии с ОФС «Определение бычьего сывороточного альбумина методом ракетного иммуноэлектрофореза в биологических лекарственных препаратах». В качестве антисыворотки допускается использовать сыворотку, преципитирующую белки сыворотки крови рогатого скота адсорбированную кроличью диагностическую для судебно-медицинских целей жидкую. Чувствительность сыворотки определяют предварительно и используют в концентрации, при которой с 0,5 мкг/мл БСА образуется четкая ракета с высотой пика не менее 1 мм.

Стерильность. Должна быть стерильной. Испытание на отсутствие бактерий и грибов проводят методом прямого посева или мембранной фильтрации на тиогликолевой среде в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность. Должна быть апирогенной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Доза препарата для введения составляет 1 прививочную дозу, вводимую внутривенно в объеме 1 мл.

Аномальная токсичность. Должна быть нетоксичной. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Морским свинкам вводят по 2 мл восстановленной растворителем вакцины подкожно, мышам – по 1 мл восстановленной растворителем вакцины внутрибрюшинно.

Специфическая безопасность. Вакцина не должна содержать живой вирус бешенства. Для определения специфической безопасности проводят пассаж вакцины в первичной культуре клеток почек сирийских хомячков. В 2 флакона, содержащие питательную среду с гидролизатом лактальбумина

(0,5 %) в растворе Хенкса для культур клеток, вносят по 200 мл клеточной взвеси, содержащей 300–600 тыс клеток/мл. В среду добавляют 10 % раствор сыворотки крови крупного рогатого скота жидкой. В качестве контроля используют 2 флакона с незараженной первичной культурой клеток почек сирийских хомячков. Объем и концентрация клеток, вносимых в опытные и контрольные флаконы, должны быть одинаковыми.

Культуру инкубируют в течение 5–6 сут при температуре (36 ± 1) ºС. Затем отбирают флаконы с полностью сформировавшимся клеточным монослоем. Для испытания на специфическую безопасность от каждой серии отбирают по 25 ампул с препаратом. В каждую ампулу вносят по 1 мл растворителя. Восстановленную вакцину объединяют в одну емкость. Из отобранных флаконов с культурой клеток сливают культуральную жидкость. В каждый опытный флакон вносят по 12,5 мл растворенной вакцины, 2 незараженных флакона оставляют (контрольные). Все флаконы инкубируют при температуре (36 ± 1) ^{o}С в течение 90 мин, после чего в опытные и контрольные флаконы вносят по 200 мл питательной среды с гидролизатом лактальбумина (0,5 %) в растворе Хенкса для культур клеток. В поддерживающую среду добавляют 5 % СКРС и канамицин до конечной концентрации 100 мкг/мл или 4 % раствор для инъекций гентамицина сульфата до конечной концентрации 80 мкг/мл. На –8 сут инкубации при температуре (32 ± 1) ^{o}С из каждого опытного флакона отбирают по 5 мл культуральной жидкости, смешивают пробы и вводят в головной мозг по 0,03 мл смеси 10 беспородным мышам массой от 6 до 7 г.

Аналогично испытывают культуральную жидкость из контрольных флаконов.

За животными наблюдают 21 сут. За весь период наблюдения не должно регистрироваться ни одного случая смерти от бешенства животного, получившего культуральную жидкость из опытных флаконов. Диагноз устанавливают на основании результатов иммунофлуоресценции (РИФ).

В случае, если в опытной группе зарегистрирована неспецифическая

гибель (в первые 4 сут наблюдения) более 2 мышей, испытание повторяют.

При появлении хотя бы у 1 мыши клинических признаков бешенства (тремор конечностей, атаксия, паралич) или при гибели более 2 мышей без клинических признаков заболевания, начиная с 5 сут наблюдения, головной мозг павших животных исследуют методом иммунофлуоресценции. При получении положительных результатов серию считают не выдержавшей испытания; при получении отрицательного результата проводят повторный контроль на удвоенном количестве образцов вакцины и удвоенном количестве мышей.

В случае отрицательного результата при повторном испытании считают, что вакцина не содержит живого вакцинного вируса бешенства. В случае регистрации при повторном контроле хотя бы у 1 мыши клинических признаков бешенства, подтвержденного иммунофлуоресценцией, испытуемую серию вакцины считают не выдержавшей испытания.

Специфическая активность. Не менее 2,5 Международных Единиц (МЕ) в 1 дозе. Определение специфической активности проводят по методике Национального института здоровья США (NIH). Специфическую активность испытуемой вакцины определяют в сравнении со стандартным образцом (СО) специфической активности вакцины антирабической культуральной концентрированной очищенной инактивированной, калиброванным по отношению к Международному стандарту антирабической вакцины. Для определения специфической активности от серии отбирают не менее 3 ампул на каждую иммунизацию.

В каждую ампулу вносят растворитель из расчета 1 мл на 1 дозу вакцины. Полученные растворы объединяют и готовят ряд разведений с пятикратным интервалом в соотношении 1:5; 1:25; 1:125; 1:625; 1:3125 на 0,9 % стерильном растворе натрия хлорида или на среде 199, содержащей 0,1 % альбумина. Разведения, используемые для иммунизации животных, указывают в нормативной документации.

Аналогичным образом готовят разведения стандартного образца, предварительно восстановленного водой для инъекций до содержания 1 МЕ в 1 мл.

Пробирки с разведенной вакциной и стандартным образцом хранят на льду в течение времени постановки опыта, но не более 4 ч.

Для иммунизации используют мышей линии Balb/c или беспородных мышей массой (12 ± 2) г без различия пола. Каждым разведением вакцины и стандартного образца иммунизируют не менее 11 животных; 40 мышей из этой же партии (контрольная группа) содержат в отдельных клетках до проведения титрования фиксированного вируса бешенства штамм «CVS» (тест-штамм). Мышей иммунизируют внутрибрюшинно по 0,5 мл 2 раза с интервалом 7 сут. На 7 сут после второй иммунизации вводят фиксированный вирус бешенства штамм CVS интрацеребрально в объеме 0,03 мл шприцем вместимостью 1 $см^3$. Для заражения всех иммунизированных животных применяют разрешающее (рабочее) разведение вируса бешенства, содержащее от 20 до 100 LD_{50}/0,03 мл вируса.

Одновременно с заражением иммунизированных мышей на неиммунизированных мышах из контрольной группы проводят титрование фиксированного вируса бешенства штамм CVS для определения точной дозы вируса, взятой в испытание. Для этого используют разрешающее (рабочее) разведение вируса (10^0) и его десятикратные разведения (10^{-1}; 10^{-2}; 10^{-3}) на
2 % растворе сыворотки крови лошади нормальной, приготовленном с применением стерильной воды очищенной или воды для инъекций. Сыворотку крови лошади нормальную предварительно инактивируют при температуре 56 ^{o} С в течение 30 мин. Каждым разведением вируса заражают не менее чем по 10 мышей интрацеребрально в объеме 0,03 мл.

За мышами наблюдают в течение 14 сут. При оценке результатов опыта учитывают мышей, заболевших или павших с 5 по 14 сут. Учет проводят ежедневно. Клиническими симптомами на разных стадиях развития

заболевания могут быть: взъерошенная шерсть, замедленные и/или круговые движения, дрожание, парез, параличи.

После окончания опыта вычисляют точное количество вируса, содержащееся в 0,03 мл разрешающего разведения, по методу Рида и Менча.

Рассчитывают конечные разведения вакцины и стандартного образца, защищающие 50 % животных ($КР_{50}$), по следующей формуле:

$$T = A + \frac{50 - B}{C - B} \cdot Д,$$

где: T – показатель степени десятичного логарифма;

A – логарифм обратной величины разведения, при котором смертность животных ниже 50 %;

B – показатель смертности животных ниже 50 %;

C – показатель смертности животных выше 50 %;

$Д$ – логарифм кратности разведения.

$$КР_{50}=10^{-T}$$

Специфическую активность испытуемой вакцины ($СА$) определяют в МЕ относительно специфической активности стандартного образца по формуле:

$$СА = \frac{К}{М} \cdot У \cdot 1,$$

где: $К$ – величина, обратная $КР_{50}$ испытуемой вакцины;

$М$ – величина, обратная $КР_{50}$ стандартного образца;

$У$ – количество МЕ в 1 мл восстановленного стандартного образца (1 МЕ);

1 – доза (1 мл).

В том случае, когда при проведении испытания специфическая активность вакцины менее нормативных требований, допускается проведение повторного испытания.

Термостабильность. Вакцина должна быть термостабильной. После инкубирования образцов при температуре 37 ºС в течение 4 недель специфическая активность вакцины должна быть не менее 2,5 МЕ в 1дозе (раздел «Специфическая активность»). Испытанию на «Термостабильность» подвер-

гают не менее 2 серий вакцины ежегодно.

Растворитель, выпускаемый в комплекте с препаратом. В нормативной документации указывают растворитель и методику, по которой проводят испытания растворителя.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С.

Вакцина против гепатита В рекомбинантная

ФС.3.3.1.0026.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину гепатита В рекомбинантную, которая представляет собой поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg), серотипа ad или ay, полученный методом рекомбинантной ДНК, который очищен с помощью последовательно применяемых физико-химических методов и адсорбирован на алюминия гидроксиде, разрешенном для парентерального введения. Антиген продуцируется культурой генетически трансформированных дрожжевых клеток (*Saccharomyces cerevisiae, Pichia pastoris* или *Hansenula polymorpha*).

В 1 мл препарата содержится 20 мкг поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) и вспомогательные вещества: сорбент и консервант. Возможен выпуск препарата без консерванта.

Вакцина предназначена для профилактики вирусного гепатита В.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство вакцины должно осуществляться с соблюдением установленных требований к правилам организации производства и контроля качества лекарственных препаратов, гарантирующим ее качество, стабильность и безопасность для человека.

Производственный штамм. Производственный штамм – рекомбинантный штамм дрожжей, продуцирующий HBsAg (указывают штамм-продуцент

дрожжей и субтип вируса гепатита В). В нормативной документации производителя должны быть указаны полные характеристики рекомбинантного производственного штамма: клетки хозяина в сочетании с системой вектора экспрессии, отсутствие контаминирующих агентов; данные о стабильности плазмиды грибов в процессе хранения культуры. Морфологические, культуральные и физико-биохимические свойства штамма-продуцента рекомбинантного штамма дрожжей, продуцирующий HBsAg, должны сохраняться при температуре минус (70 ± 1) °С в течение 1 г.

Характеристика субстанции

Степень чистоты субстанции должна быть охарактеризована с помощью методов определения доли потенциальных загрязняющих белков в общем белке препарата – методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) или с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Степень очистки HBsAg должна быть не менее 95 %. Количество остаточной ДНК дрожжевых клеток должно составлять не более 10 пг/доза.

Содержание HBsAg в субстанции определяют методом иммуноферментного анализа (ИФА). В качестве образца сравнения может использоваться высокоочищенный референс-препарат предприятия с известным содержанием HBsAg и белка. Образцы сравнения на основе продукта, содержащего консервант, не пригодны в случае испытания препаратов, не содержащих консервант.

Содержание липидов и углеводов должно определяться в субстанции (in balk) до процедуры адсорбции антигена на алюминия гидроксиде.

Пенициллин и другие антибиотики группы бета-лактамов не должны использоваться ни на одном из этапов производства.

В случае, когда при очистке субстанции используют моноклональные антитела (иммунологическая аффинная хроматография для очистки HBsAg), используемые антитела должны быть охарактеризованы и определена степень их очистки.

Референс-препараты. Для определения иммуногенности рекомби-

нантных вакцин против гепатита В могут быть использованы препараты сравнения (референс – препараты) – аналогичные вакцины того же производства, представляющие собой часть серии, иммуногенная активность которой была подтверждена в тестах *in vivo.*

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Гомогенная суспензия белого с серым оттенком цвета без видимых посторонних включений, при отстаивании разделяющаяся на 2 слоя: верхний – бесцветная прозрачная жидкость, нижний – белый осадок. При встряхивании суспензия должна легко ресуспендироваться.

Подлинность. Препарат должен содержать белок, идентичный поверхностному антигену вируса гепатита В (HBsAg). Определение проводят методом ИФА с использованием коммерческих тест-систем для выявления HBsAg с чувствительностью не более 0,1 МЕ/мл в соответствии с инструкцией по применению (раздел «Специфическая активность»). Возможно определение подлинности методом электрофореза в ПААГ в редуцирующих условиях при окрашивании раствором серебра нитрата после десорбции белка согласно ОФС «Электрофорез» и ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле». При окрашивании геля раствором серебра нитрата должна выявляться основная полоса мономера с молекулярной массой (24 ± 2) кДа, а также может присутствовать дополнительная менее интенсивная полоса димера с молекулярной массой (45 ± 2) кДа.

Проходимость через иглу. Гомогенная взвесь, диспергированная путем встряхивания, должна свободно проходить в шприц через иглу 0,8·40, если нет других указаний в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Суспензии».

Время седиментационной устойчивости. Суспензия вакцины не должна расслаиваться в течение 5 мин после встряхивания. Определение проводят в соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH. От 6,4 до 7,4. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Извлекаемый объём. Должен быть не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Стерильность. Препарат должен быть стерильным. Испытания проводят методом прямого посева или мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность».

Бактериальные эндотоксины. Не более 30 ЕЭ/мл, если нет других указаний в нормативной документации производителя. Определение проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины» (Гель-тромб тест. Качественный анализ).

Пирогенность. Препарат должен быть апирогенным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Тест-доза — 0,5 мл на 1 кг массы кролика. Вводится внутривенно. Определение пирогенности является альтернативным определению бактериальных эндотоксинов.

Общий белок. Не более 25 мкг/мл. Определение проводят по методу Лоури с предварительной десорбцией белка в соответствии с ОФС «Определение белка колориметрическим методом (метод Лоури) в биологических лекарственных препаратах». Условия десорбции должны быть валидированы под конкретный препарат каждым производителем.

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичным. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Тест-доза для морских свинок – 1 мл (20 мкг) подкожно, для мышей – 1 мл (20 мкг) внутрибрюшинно. Наблюдение проводят в течение 7 сут.

Специфическая активность. Специфическую активность характери-

зуют, определяя содержание HBsAg методом ИФА или иммуногенную активность в тестах *in vivo* на мышах.

Определение содержания HBsAg методом ИФА. Содержание HBsAg должно быть не менее 80 % по отношению к препарату сравнения. В качестве препарата сравнения используют референс-вакцину фирмы-производителя. Определение проводят в соответствии с ОФС «Метод иммуноферментного анализа» с использованием коммерческих тест-систем для выявления HBsAg с чувствительностью не ниже 0,1 МЕ/мл в соответствии с инструкцией по применению.

Процедура приготовления растворов для разведений и рабочие разведения должны быть валидированы для конкретного препарата каждым производителем.

Определение содержания HBsAg в испытуемом образце вакцины проводят параллельно с определением содержания антигена в референс-вакцине фирмы-производителя. Процент содержания антигена в испытуемом препарате должен быть определен нормативной документацией. Испытания осуществляют в соответствии с инструкцией по применению используемой тест-системы.

Учет результатов. Содержание HBsAg в испытуемой вакцине и в образце сравнения рассчитывают методом параллельных линий (программа «PARALINE» или аналогичная). В результате автоматического дисперсионного анализа получают значения относительной активности поверхностного антигена по отношению к референс-препарату в процентах.

Иммуногенная активность на мышах (тест in vivo). Вакцина должна стимулировать выработку антител к HBsAg у однократно иммунизированных мышей линии Balb/c. Отношение дозы иммуногенной активности референс-препарата вакцины гепатита В, вызывающей выработку антител у 50 % мышей ($ЕД_{50}$ референс-препарата), к $ЕД_{50}$ испытуемой вакцины должно быть не менее 0,5.

В качестве препарата сравнения используют референс-препарат произ-

водителя.

Раствор для разведения образцов вакцины – 0,9 % раствор натрия хлорида, содержащий 0,35 – 0,65 мг/мл алюминия гидроксида. Данный раствор используют и при иммунизации животных в качестве отрицательного контроля.

Процедура приготовления образцов отрицательного контроля, испытуемой вакцины и референс-препарата для иммунизации мышей, а также количество животных должны быть описаны в нормативной документации производителя. Животным вводят внутрибрюшинно по 1 мл соответствующего разведения исследуемого препарата, референс-вакцины и отрицательного контроля.

Через 28 – 30 дней животных обескровливают. Полученные индивидуально от каждого животного сыворотки анализируют на наличие антител методом ИФА с использованием тест-систем для количественного определения антител к поверхностному антигену вируса гепатита В с чувствительностью 5 – 10 мМЕ/мл в соответствии с инструкцией по применению.

Учет результатов. Вычисляют среднее арифметическое значение оптической плотности сывороток невакцинированной группы животных (отрицательный контроль). Положительными считают сыворотки, показания оптической плотности которых равны или выше среднего арифметического отрицательного контроля плюс коэффициент тест-системы. Для каждой группы мышей вычисляют процент эффективности (показатель сероконверсии (ПСК) в % по формуле:

$$\frac{\text{количество сероположительных мышей в группе}}{\text{общее количество мышей в группе}} \cdot 100$$

Методом пробит-анализа или методом скользящих средних на основании ПСК рассчитывают $ЕД_{50}$ испытуемой серии вакцины и референс-образца. Находят отношение $ЕД_{50}$ референс-препарата к $ЕД_{50}$ испытуемой

вакцины.

Полнота сорбции антигена. Количество несвязанного поверхностного антигена вируса гепатита В должно быть не более 1 % от номинального количества. Испытуемый образец вакцины в объеме 1000 мкл центрифугируют при 6000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре, если в нормативной документации не даны другие указания. В качестве референс-препарата используют несорбированный HBsAg с известной концентрацией. Процедура разведения надосадочной жидкости, референс-препарата и буфер для разведений должны быть валидированы для конкретного препарата каждым производителем.

Определение несвязанного поверхностного антигена в надосадочной жидкости проводят методом ИФА с использованием коммерческих тест-систем для выявления HBsAg с чувствительностью не ниже 0,1 МЕ/мл по отношению к референс-препарату. Количество несвязанного поверхностного антигена вируса гепатита В определяют по калибровочному графику референс-образца, используя программу «PARALINE» или аналогичную, либо полноту сорбции (X) в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot F_{1\ \text{разведения}}}{B \cdot F_{2\ \text{разведения}}} \cdot 100,$$

где: A – среднее значение оптической плотности надосадочной жидкости;

B – среднее значение оптической плотности референс препарата;

$F_{1\ \text{разведения}}$ – фактор разведения надосадочной жидкости.

$F_{2\ \text{разведения}}$ – фактор разведения референс - образца.

Консервант. Тиомерсал. От 0,03 до 0,07 мг в 1 мл вакцины и от 0,018 до 0,035 мг в 0,5 мл вакцины. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение тиомерсала в биологических лекарственных препаратах».

Сорбент. Алюминия гидроксид**.** От 0,35 до 0,65 мг в 1 мл и от 0,18 до 0,32 мг в 0,5 мл вакцины. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение ионов алюминия в сорбированных биологических лекарственных препаратах».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты». Маркировка вторичной упаковки должна содержать предупредительные надписи: «Перед употреблением встряхивать», «Хранить в не доступном для детей месте», «Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений», «Не замораживать».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С.

Вакцина гриппозная живая ФС.3.3.1.0027.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину гриппозную аллантоисную живую, которая представляет собой аттенуированные реассортантные вирусы гриппа типов А и В, полученные из вируссодержащей аллантоисной жидкости, выращенные раздельно на развивающихся куриных эмбрионах. Препарат лиофильно высушен со стабилизатором. Препарат вызывает формирование специфического иммунитета против гриппа.

Вакцина предназначена для специфической профилактики гриппа.

ПРОИЗВОДСТВО

Все этапы производства вакцины должны осуществляться с соблюдением установленных требований к правилам организации производства и контролю качества лекарственного препарата, гарантирующих его качество и безопасность для человека, в помещениях, исключающих работу с другими патогенными микроорганизмами и антибиотиками. Не допускается производство препарата на территории, на которой расположены производственные здания по производству антибиотиков, если не соблюдены требования к защитным зонам, согласно действующим санитарным правилам. Обязательным условием технологического процесса производства вакцины является соблюдение поточности, исключающей возможность перекреста промежуточных продуктов и полуфабрикатов, получаемых на разных стадиях произ-

водства, и их контаминацию посторонними веществами, в первую очередь посторонней микрофлорой. В производственных помещениях запрещается работа с другими вирусами гриппа, кроме вакцинных. Сотрудники, работающие на производстве живой гриппозной вакцины, не должны контактировать с другими инфекционными агентами в течение того же рабочего дня.

Все производственные процессы, технологическое оборудование и методы контроля должны быть валидированными. Качество исходного сырья и материалов, используемых в производстве должно быть подтверждено соответствующими документами (допустимо использование компонентов только фармакопейного качества). В состав вакцины должны входить вспомогательные компоненты, стабилизаторы, не снижающие эффективности вакцины, разрешенные к медицинскому применению в дозах, не вызывающих токсические, аллергические или иные нежелательные реакции у человека.

Производство вакцины включает несколько стадий с обязательным внутрипроизводственным контролем: получение посевного вируса; накопление вируса; объединение его со стабилизатором; лиофилизация; с указанием название защитного газа, используемого при запайке ампул, производство лекарственной формы препарата; маркировку; фасовку. На каждой стадии должны быть предусмотрены: система и схема анализа показателей качества в ходе технологического процесса и испытания конечного продукта; хранение промежуточных и конечного продуктов, обеспечивающее стабильность качества в течение срока годности продуктаШтаммовый состав вакцин ежегодно рекомендуется ВОЗ и национальной Комиссией по гриппозным вакцинным и диагностическим штаммам.

Куриные эмбрионы должны быть получены из птицехозяйств, благополучных по возбудителям, патогенным для человека. Качество поставляемых эмбрионов должно быть подтверждено ветеринарными свидетельствами.

Производственные штаммы: используются аттенуированные, реассортантные штаммы вируса гриппа типа А и В. Источник и история пассажей

должны быть известны. Вакцинный вирус должен быть генетически стабильным, иммуногенным, не передаваться восприимчивым индивидуумам и иметь соответствующие лабораторные маркеры аттенуации. Его иммуногенность и безопасность для человека должны быть предварительно установлены. Продукция вакцины основывается на системе посевных вирусов (seed-lot). Из штамма готовится маточный материал или главный посевной вирус, который должен храниться при температуре минус 70 °С в жидком виде или при температуре минус 20 °С в лиофильно высушенном виде. Штаммы и маточный материал должны быть проверены по всем биологическим свойствам в соответствии с регламентированными требованиями.

Вакцинные штаммы вирусов гриппа типа А и В рекомендованные ВОЗ, ЕС и Комиссией по гриппозным вакцинным и диагностическим штаммам должны соответствовать по антигенной структуре антигенной разновидности вирусов гриппа подтипов A(H_1N_1), A(H_3N_2) и типа В на текущий эпидемический сезон, иметь известную историю пассажей и источник выделения.

Из маточного материала готовят рабочий посевной вирус. Финальный сбор представляет собой не более пятого пассажа от вакцинного вируса.

Антибиотики: пенициллин или стрептомицин нельзя использовать ни на одной из стадий производства.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Аморфная масса от белого до светло-коричневого цвета. Определяют визуально.

Подлинность. Моновакцины должны взаимодействовать с соответствующими гомологичными типоспецифическими сыворотками и не взаимодействовать с сыворотками к другим типам и подтипам вируса гриппа. Титр с гетерологичной сывороткой должен быть ниже ее собственного титра, по крайней мере, в 4 раза. Определение проводят в полуфабрикатах (моновакцинах), лиофилизированных одновременно с трехвалентным препаратом, в реакции торможения гемагглютинации (РТГА).

Метод постановки РТГА с вирусом гриппа (макрометод). РТГА применяют для установления типа и подтипа вируса, т.е. специфичности, а также для определения нарастания титров специфических антител. Постановка РТГА включает следующие этапы работы: приготовление взвеси эритроцитов, определение гемагглютинирующего титра антигена в реакции гемагглютинации (РГА) и рабочей дозы вируса, постановка самой реакции. Для постановки реакции необходимы следующие ингредиенты:

– антиген (вакцина, вируссодержащая жидкость – аллантоисная или культуральная);

– иммунные сыворотки к различным серотипам вируса гриппа;

– фосфатный буферный раствор pH 7,2 ± 0,2;

– взвесь куриных эритроцитов, 1 %.

1. *Приготовление взвеси куриных эритроцитов*. Для постановки РТГА используют эритроциты петухов. Кровь у петухов берут из сердца или подкрыльцовой вены.

Свежеполученную кровь от 3–5 петухов помещают во флакон со стеклянными бусами или же с одним из антикоагулянтов (раствор Альсевера, 5% раствор натрия цитрата). Дефибринирование крови проводят немедленно путем интенсивного встряхивания флакона в течение 5–7 мин при температуре (20 ± 2) °С до выпадения волокон фибрина.

Дефибринированную кровь фильтруют через 4 слоя марли, затем трехкратно отмывают фосфатным буферным раствором (на 1 объем крови – 4 объема фосфатного буферного раствора) при центрифугировани (800 ± 200) об/мин в течение (15 ± 5) мин. Надосадочную жидкость удаляют. Из осадка, принимаемого за 100 %, готовят 1 % суспензию куриных эритроцитов по объему.

2. *Определение гемагглютинирующего титра антигена*. В круглодонных лунках плексигласового планшета готовят двукратные разведения антигена (титруемого вируса из испытуемой вакцины) в объеме 0,4 мл на фос-

фатном буферном растворе, начиная с 1:10 до 1:1280. В каждую лунку вносят по 0,4 мл 1 % суспензии эритроцитов. Содержимое лунок перемешивают встряхиванием планшеты и оставляют при температуре (20 ± 2) °С на 40–45 мин (до оседания эритроцитов в контроле).

Реакцию оценивают по «четырехкрестовой» системе. За титр антигена, или одну агглютинирующую единицу (АЕ), принимают наибольшее разведение антигена, дающее четко выраженную агглютинацию эритроцитов (+++ или ++++).

Определение титра антигена сопровождается отрицательным контролем на отсутствие спонтанной агглютинации эритроцитов. С этой целью в контрольную лунку того же плексигласового планшета вносят 0,4 мл фосфатного буферного раствора и 0,4 мл 1 % суспензии эритроцитов. При отсутствии спонтанной агглютинации на дне лунки выпадает гомогенный с ровными краями осадок эритроцитов (отрицательная реакция).

3. *Приготовление рабочей дозы антигена*. В РТГА рабочей дозой антигена является то разведение антигена, в 0,2 мл которого содержится 4 агглютинирующие единицы (4 АЕ). Для ее вычисления следует установленную величину титра антигена разделить на 8. Полученная от деления цифра указывает во сколько раз нужно развести антиген, чтобы в 0,2 мл его содержалось 4 АЕ (рабочая доза).

Перед постановкой основного опыта проверяют точность приготовления рабочей дозы (4 АЕ). Для этого в пять лунок горизонтального ряда плексигласового планшета, начиная со второй, вносят по 0,2 мл фосфатного буферного раствора. В 1-ю и 2-ю лунки добавляют по 0,2 мл приготовленной рабочей дозы антигена. После перемешивания переносят 0,2 мл смеси из лунки в лунку, начиная со 2-й по 5-ю лунку, из 5-й лунки 0,2 мл удаляют. Затем в каждую лунку добавляют по 0,2 мл фосфатного буферного раствора и по 0,4 мл 1 % суспензии куриных эритроцитов. В 6-й лунке ставят контроль на отсутствие спонтанной агглютинации эритроцитов. После встряхивания смесь оставляют при температуре (20 ± 2) °С на 40–45 мин (до оседания

эритроцитов в контроле).

При правильном выборе рабочей дозы полная (++++) агглютинация эритроцитов должна наблюдаться только в первых трех лунках. В 4-й и 5-й лунках агглютинация должна отсутствовать. В случае отклонения от указанного выше, разведение антигена должно быть изменено путем добавления соответствующего количества антигена или фосфатного буферного раствора для получения необходимой рабочей дозы. При этом необходимо повторно проверить правильность приготовления рабочей дозы.

4. *Постановка реакции торможения гемагглютинации.* Сыворотки, используемые в РТГА, могут содержать неспецифические ингибиторы гемагглютинации. Поэтому для их удаления перед постановкой РТГА сыворотки необходимо обработать нейраминидазой холерных вибрионов или RDE-реагентом (Примечания).

После удаления неспецифических ингибиторов готовят двукратные разведения сывороток в лунках плексигласовой доски, начиная с 1:10 до 1:640 и выше в объеме 0,2 мл. К каждому разведению сыворотки добавляют по 0,2 мл рабочей дозы антигена (4 АЕ). Смесь встряхивают и после контакта антигена и сыворотки (от 30 мин до 1 ч) при температуре (20 ± 2) °С в каждую лунку добавляют по 0,4 мл 1 % суспензии куриных эритроцитов. Смесь повторно встряхивают, оставляют при температуре (20 ± 2) °С в течение 40–45 мин (до оседания эритроцитов в контроле), после чего производят учет результатов реакции.

При наличии специфических антител в сыворотке наступает задержка агглютинации эритроцитов. За титр сыворотки принимают предельное разведение, вызывающее полную задержку гемагглютинации.

Задержка гемагглютинации указывает на соответствие типа антигена и взятой сыворотки; отсутствие задержки гемагглютинации свидетельствует о несоответствии типа взятой сыворотки.

Примечания

1. Удаление неспецифических ингибиторов гемагглютинации из

иммунных сывороток с помощью нейраминидазы холерных вибрионов или RDE-реагентом. При наличии инструкции по применению коммерческого реактива необходимо следовать требованиям, изложенным в данном документе. Метод основан на способности нейраминидазы холерных вибрионов, не действуя на специфические антитела, разрушать ингибиторы гемагглютинации к вирусам гриппа А и В в сыворотках крови человека, кур, крыс, кролика.

К 1 объему сыворотки добавляют 3 объема реагента нейраминидазы. К смеси, состоящей из 0,1 мл сыворотки и 0,3 мл реагента нейраминидазы добавляют 0,6 мл фосфатного буферного раствора для получения разведения сыворотки 1:10. Далее смесь инкубируют при температуре (37 ± 2) °С в течение 18 – 20 час и затем прогревают при температуре (56 ± 2) °С в течение 30 мин. Сыворотка, обработанная нейраминидазой, может быть использована для постановки РТГА в течение 2 недель при условии ее хранения при температуре (5 ± 1) °С.

2. Приготовление 0,1 М раствора фосфатного буферного pH 7,2 ± 0,2.

Раствор 1. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 17,8 г натрия фосфата двузамещенного 2 – водного ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$), растворяют в 500 мл воды очищенной, доводят объём раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Раствор 2. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 15,6 г натрия фосфата однозамещённого 2–водного ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$), растворяют в 500 мл воды очищенной, доводят объём раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносят 720 мл раствора 1, прибавляют 280 мл раствора 2 и перемешивают. Затем в мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 100 мл приготовленного 0,1 М фосфатного буферного раствора доводят объём раствора водой очищенной до метки, перемешивают, прибавляют 8,5 г натрия хлорида и вновь перемешивают. pH полученного раствора должен быть 7,2 ± 0,05. Если показатель pH выше или ниже требуемого, его соответственно доводят 1 М раствором хлористоводородной кислоты или 1 М раствором натрия гидроксида.

Приготовление раствора Альсевера.

Состав:

– 2,05 % глюкозы;
– 0,42 % натрия хлорида;
– 0,8 % натрия цитрата;
– 100,0 мл воды очищенной

pH раствора доводят с помощью 5 % раствора лимонной кислоты до pH 5,6 (примерно 10 мл 5 % раствора лимонной кислоты на 1 л раствора Альсевера). Раствор стерилизуют фильтрацией или автоклавированием в течение 3 последовательных дней при температуре 100 °С и давлении 0,7 атм. Для консервирования раствора добавляют на 1 мл крови 1,2 мл раствора Альсевера.

В данном растворе эритроциты можно хранить при температуре (4 ± 2) °С в течение 1–2 нед. Перед употреблением эритроциты необходимо трехкратно отмыть фосфатным буферным раствором с помощью центрифугирования при (800 ± 200) об/мин в течение 10 мин.

3.Приготовление консервирующего 5 % раствора натрия цитрата. 5% раствор натрия цитрата перед использованием разводят в 2 раза 0,1 М фосфатным буферным раствором. К одной части полученного раствора натрия цитрата добавляют 2 части крови петухов. В данном растворе эритроциты могут храниться при температуре (4 ± 2) °С в течение 3 – 5 сут.

Метод постановки РТГА с вирусом гриппа (микрометод). Принцип метода, его учет и ингредиенты для реакции, проводимой микрометодом, те же, что и для проведения РТГА макрометодом. Отличие методов заключается в изменении концентрации и объемов ингредиентов.

Реакцию ставят на микропанели с «U»-образными лунками.

1. Приготовление 0,5 % взвеси куриных эритроцитов. Взвесь готовят из 1 % суспензии эритроцитов (макрометод) разведением ее в 2 раза фосфатным буферным раствором (в соотношении 1:1).

2. Определение гемагглютинирующего титра антигена. В каждую лунку микропанели одного ряда вносят фосфатный буферный раствор в объеме 50 мкл. Затем в первую лунку вносят 50 мкл антигена в разведении 1:10 и далее проводят титрование по принципу двукратного разведения. Из последней лунки удаляют 50 мкл. Затем в каждую лунку вносят по 50 мкл 0,5 % суспензии эритроцитов. Содержимое лунок перемешивают встряхиванием и оставляют при комнатной температуре на 40 – 45 мин до оседания эритроцитов в контроле.

Реакцию оценивают по «четырехкрестовой» системе. За титр антигена, или одну агглютинирующую единицу (АЕ), принимают наибольшее разведение антигена, дающее четко выраженную агглютинацию эритроцитов (+++ или ++++).

Определение титра антигена сопровождается постановкой отрицательного контроля на отсутствие спонтанной агглютинации эритроцитов. В качестве отрицательного контроля служат несколько лунок панели, в которые вместо антигена внесен фосфатный буферный раствор.

3. Приготовление рабочей дозы антигена. Рабочая доза антигена при постановке РТГА микрометодом равна 8 АЕ. Для её приготовления гемагглютинирующий титр делят на 16. Полученное значение указывает во сколько раз необходимо развести антиген.

Пример разведения антигена: титр антигена равен 160. Разделив 160 на 16, получается цифра 10, указывающая на то, что антиген необходимо развести в 10 раз.

Перед постановкой основного опыта проверяют точность приготовления рабочей дозы (8 АЕ). Для этого в шесть лунок микропанели, начиная со второй, вносят по 25 мкл фосфатного буферного раствора. В 1 и 2 лунки добавляют по 25 мкл приготовленной рабочей дозы антигена. После перемешивания 25 мкл смеси переносят из 2 лунки в 3, из 3 – в 4 и т.д. Из последней лунки панели 25 мкл удаляют. Затем во все лунки добавляют по 25 мкл фосфатного буферного раствора и по 50 мкл 0,5 % суспензии эритроцитов. После встряхивания смесь оставляют при температуре (20 ± 2) °С на 40 – 45 мин до оседания эритроцитов в контроле.

При правильном выборе рабочей дозы агглютинация эритроцитов должна наблюдаться только в четырех лунках панели. В остальных лунках агглютинация должна отсутствовать. В случае отклонения от указанного результата добавляют антиген или фосфатный буферный раствор для получения необходимой рабочей дозы.

4. Постановка реакции торможения гемагглютинации. Метод постановки реакции микрометодом соответствует таковому, описанному для макрометода, за исключением объемов используемых ингредиентов реакции.

Готовят двукратные разведения сыворотки в объеме 25 мкл, вносят рабочую дозу антигена (8 АЕ) в объеме 25 мкл и после контакта антигена и сыворотки (от 30 мин до 1 ч) при температуре (20 ± 2) °С в каждую лунку панели вносят по 50 мкл 0,5 % взвеси эритроцитов. После оседания эритроцитов в контроле (как правило, через 40 – 45 мин) проводят учет результатов (макрометод).

За титр сыворотки принимают величину обратную ее разведению, при котором отсутствует агглютинация эритроцитов.

ИСПЫТАНИЯ ПРЕПАРАТА

Описание. Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость.

Время растворения (лиофилизированный препарат). Содержимое ампулы должно полностью раствориться в течение 3 мин при встряхивании в 0,5 мл воды. Определение проводят визуально.

Прозрачность. Должен быть прозрачным или выдерживать сравнение с эталоном, указанным в фармакопейной статье. Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности».

Цветность. Должен быть бесцветным или выдерживать сравнение с эталоном, указанным в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

pH. От 7,0 до 8,0. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Потеря в массе при высушивании (лиофилизированный препарат). Не более 2,5 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Стерильность. Препарат должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Отсутствие посторонних вирусов, микоплазм, микобактерий туберкулеза. Препарат не должен содержать микоплазм, микобактерий туберкулеза, посторонних вирусов. Определяют в вируссодержащей аллантоисной жидкости до добавления стабилизатора в соответствии с ОФС «Испытание вирусных вакцин на присутствие посторонних агентов».

При контроле на наличие посторонних вирусов испытания проводятся на 3-х клеточных культурах и куриных эмбрионах. При нейтрализации вируса гриппа не следует использовать иммунные сыворотки птичьего, обезьяньего или человеческого происхождения. Вирус, используемый для получения гипериммунной сыворотки, должен быть получен либо на культуре клеток не

птичьего происхождения, либо на куриных эмбрионах свободных от патогенов. Если используются куриные эмбрионы, они должны быть получены от других групп птиц, которые не использовались для получения исследуемого вируса.

Контроль на микоплазмы проводят с использованием питательной среды для выделения и культивирования микоплазм полужидкую (среда Каган) с использованием нормальной сыворотки крови лошади.

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Доза для мышей 0,5 мл внутрибрюшинно.

Специфическая активность. Препарат должен обладать инфекционной активностью не менее $10^{6,9}$ $ЭИД_{50}$/доза (эмбриональная инфекционная доза) для штаммов вируса гриппа типа А и не менее $10^{6,4}$ $ЭИД_{50}$/доза для штамма вируса гриппа типа В. Определение проводят в полуфабрикатах (моновакцинах), лиофилизированных одновременно с трехвалентным препаратом по методике, изложенной ниже.

Определение проводят на развивающихся куриных эмбрионах 10 – 12-дневного возраста.

Готовят десятикратные разведения вируса (вакцины) в 4,5 мл фосфатного буферного раствора pH от 7,0 до 7,4 (каждое разведение отдельной пипеткой. По 0,2 мл вируссодержащей жидкости из разведений от 10^{-5} до 10^{-7} (разведения могут меняться в зависимости от целей исследования и предполагаемой инфекционной активности вируса) вводят в аллантоисную полость, используя на каждое разведение по 4 эмбриона. Для заражения эмбрионов используют одноразовые шприцы или проводят заражение одним шприцом, начиная с большего разведения.

Эмбрионы инкубируют при температуре, указанной в паспорте на штамм, в течение 48 ч для вируса гриппа (моновакцины) типа А и 72 ч для вируса гриппа (моновакцины) типа В. По истечении срока инкубации отдельно из каждого эмбриона отбирают по 0,4 – 0,5 мл аллантоисной жидко-

сти, помещают в 4 отдельные лунки плексигласовой доски. Затем в каждую лунку добавляют по 0,4 – 0,5 мл 1 % суспензии куриных эритроцитов. Через 30–40 мин контакта при температуре (20 ± 2) °С, после оседания эритроцитов в контроле, проводят учет гемагглютинации.

Контрольное испытание: проводят, как описано выше, но вместо аллантоисной жидкости из куриного эмбриона в свободные 4 лунки панели вносят по 0,4 – 0,5 мл фосфатного буферного раствора (pH 7,2 ± 0,2).

Вычисление биологического титра проводят по методу Рида и Менча (табл.1).

Метод основан на логической предпосылке, что тканевая культура или животное, погибшие при заражении каким-либо разведением вируса, погибнет и при заражении любым более низким разведением.

Таблица 1 – Подсчет 50 % дозы ($ТЦД_{50}$) по методу Рида и Менча

Разведение вируса	Количество тест-объектов	Исходные данные		Кумулятивные данные		Процент гибели
		погибло	выжило	погибло	выжило	
10^{-5}	4	4	0	7	0	100
10^{-6}	4	2	2	3	2	60
10^{-7}	4	1	3	1	5	17
10^{-8}	4	0	4	0	9	0

На примере подсчёта 50 % дозы ($ТЦД_{50}$ – количество цитопатогенных доз) показано, что 50 % доза находится между разведениями вируса 10^{-6} и 10^{-7}.

Далее расчет величины разведения (X), которую необходимо прибавить к разведению непосредственно ниже 50 % дозы (в $\log_{10}$), производится по следующей формуле:

$$X = \frac{A - 50}{A - B}, \qquad (1)$$

где: А – процент гибели при разведении, непосредственно ниже искомой

50 % дозы (в данном случае 60 %);

В – процент гибели при разведении непосредственно выше искомой 50 % дозы (в данном случае 17 %).

Подставляя полученные значения в формулу 1, находим:

$$X = \frac{60 - 50}{60 - 17} = 0{,}23,$$

откуда титр вируса (в обратных $\log_{10}$) равен 6 + 0,23 = 6,23; т.е., одна ТЦД$_{50}$ или LD$_{50}$ соответствует разведению вируса $10^{-6,23}$.

Если в титрование были взяты разведения вируса с интервалом 0,5 $\log_{10}$, то величину X в формуле 1 следует умножить на 0,5.

Поскольку при титровании вируса в пробирочных культурах обычно получаются четкие результаты и культуры со 100 % дегенерацией отделены от культур с полным отсутствием дегенерации всего одним разведением вируса, удобно пользоваться при подсчете титров по Риду и Менчу упрощенной схемой (табл.2).

Таблица 2 – Упрощенная схема подсчета титров по Риду и Менчу

Количество эмбрионов, зараженных разведением 10^{-n}	Количество эмбрионов с наличием гемагглютинации в аллантоисной жидкости	Титр вируса в lg
4	1	(n-1), 66
4	2	n, 0
4	3	n, 33
4	4	n, 50

Пример: 10^{-4} ++++

10^{-5} +++

10^{-6} - - -

Титр вируса в lg ИД$_{50}$/0,2 равен: n, 33 т.е. 5,33 ИД$_{50}$/0,2 мл.

Указание объема вирусной взвеси, вводимой при заражении эмбрионов, обязательно, так как величина инфекционной активности будет различной.

Для вычисления $ТЦД_{50}$ вируса в 1 мл исследуемой жидкости к показателю величины титра вируса в $\log_{10}$ прибавляют в зависимости от количества вируссодержащего материала, взятого для заражения одной культуры, соответствующие величины поправок (табл.3).

Таблица 3 – Величины поправок

Объем материала в миллилитрах, взятого для заражения одной культуры	Величина поправки в единицах логарифма
0,1	1,0
0,2	0,7
0,25	0,6
0,3	0,52
0,4	0,4
0,5	0,3
0,6	0,22
0,7	0,16
0,8	0,1

Например, если во всех пробирочных культурах, зараженных по 0,2 мл материалом в разведении 10^{-4}, наблюдается цитопатогенный эффект, а в культурах, инокулированных разведением 10^{-6}, цитопатогенного эффекта не наблюдается (при инокуляции же разведением 10^{-5} цитопатогенный эффект отмечен в одной из четырех пробирок), то титр вируса в $\log_{10}$ будет равен $10^{4,66}$. Содержание же его в 1 мл будет равно $10^{5,36}$ $ТЦД_{50}$.

Иммуногенность. Препарат должен вызывать прирост гомологичных антигемагглютинирующих антител в сыворотке крови в 4 и более раз у не менее чем 60 % привитых людей для штаммов вируса гриппа типа А и у 40 % привитых людей для штамма вируса гриппа типа В. Определение проводят на группе из 50 человек с исходным титром антител не выше 1:16. Проводят контроль первых трёх серий при введении нового штамма.

Реактогенность. Препарат не должен вызывать повышение температуры выше 37,5 °С более, чем у 2 % привитых при проверке на группе из 50 человек в возрасте от 18 до 55 лет. Контролируют первые три серии при введении нового штамма.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты». Вторичная (потребительская) упаковка, кроме общепринятых сведений, должна содержать сведения о субстрате культивирования, составе штаммов и эпидсезоне, для которого предназначен препарат.

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С в сухом месте.

Вакцина гриппозная инактивированная ФС.3.3.1.0028.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину гриппозную инактивированную (вакцину цельновирионную, которая представляет собой цельный вирус; вакцину расщепленную (сплит-вакцину), которая состоит преимущественно из разрушенных вирусных частиц; вакцину субъединичную, которая содержит в основном поверхностные антигены вируса гриппа: гемагглютинин и нейраминидазу). Антигены получают из очищенного вируса или очищенных вирусов гриппа типов А и В, одного, двух или трех штаммов, выращенных раздельно в развивающихся куриных эмбрионах. Препарат вызывает формирование специфического иммунитета против гриппа, вызываемого соответствующими штаммами.

Вакцина предназначена для специфической профилактики гриппа.

Вакцина может содержать адъювант и консервант.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство вакцины включает ряд последовательных стадий с обязательным внутрипроизводственным контролем: получение посевного вируса; накопление вируса; очистку и концентрацию; расщепление вируса (при необходимости); производство препарата; маркировку; фасовку. На каждой стадии должны быть предусмотрены: система и схема анализа

показателей качества в ходе технологического процесса и испытания конечного продукта; хранение промежуточных и конечного продуктов, обеспечивающее стабильность качества в течение срока годности продукта.

Штаммовый состав вакцин ежегодно рекомендуется ВОЗ и национальной Комиссией по гриппозным вакцинным и диагностическим штаммам. Для каждого нового штамма необходима валидация процесса расщепления вируса в моновалентном препарате сплит-вакцины и подтверждение наличия преимущественного содержания гемагглютинина и нейраминидазы в субъединичных моновакцинах. Производственные штаммы **д**олжны соответствовать по антигенной **с**труктуре вирусов гриппа подтипов A(H_1N_1) и A(H_3N_2) и типа В на текущий эпидемический сезон, с известной историей пассажей и источника выделения.

В случае использования в производстве в течение более одного эпидемического сезона производственные штаммы должны контролироваться не реже 1 раза в год.

Куриные эмбрионы должны быть получены из птицеводческих хозяйств, благополучных по возбудителям, патогенным для человека. Качество поставляемых эмбрионов должно быть подтверждено ветеринарными свидетельствами.

Все производственные процессы, технологическое оборудование и методы контроля должны быть валидированны и должны осуществляться с соблюдением установленных требований к правилам организации производства и контроля качества лекарственного препарата, гарантирующих его качество и безопасность для человека. Производство вакцины должно проводиться в помещениях, исключающих работу с другими патогенными микроорганизмами и антибиотиками. Не допускается производство препарата на территории, на которой расположены производственные здания по производству антибиотиков, если не соблюдены требования к защитным зонам, согласно действующим санитарным правилам. Обязательным

условием технологического процесса производства вакцины является соблюдение поточности, исключающей возможность перекреста промежуточных продуктов и полуфабрикатов, получаемых на разных стадиях производства, и их контаминацию посторонними веществами, в первую очередь посторонней микрофлорой.

Работа с живым и инактивированным вирусом должна проводиться в разных помещениях. Качество исходного сырья и материалов, используемых в производстве, должно быть подтверждено соответствующими документами (допустимо использование компонентов только фармакопейного качества). В состав вакцины должны входить вспомогательные компоненты, разрешенные к медицинскому применению и в дозах, не вызывающих токсические, аллергические или иные нежелательные реакции у человека.

Из маточного материала готовят рабочий посевной вирус, который должен быть представлен не более чем 15 пассажем от соответствующего производственного штамма. Финальный сбор представляет собой первый пассаж от рабочего посевного вируса.

Пенициллин или стрептомицин нельзя использовать ни на одной из стадий производства.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Бесцветная или слегка желтоватая прозрачная жидкость, возможно наличие слабой опалесценции. Определение проводят визуально.

Подлинность. Каждый подтип и тип антигена должен нейтрализоваться гомологичной сывороткой. Титр с гетерологичной сывороткой должен быть ниже ее собственного титра, по крайней мере, в 4 раза. Определение проводят на стадиях получения полуфабрикатов: объединенного вирусного концентрата или моновакцины в реакции торможения гемагглютинации (РТГА).

Метод постановки РТГА с вирусом гриппа (макрометод). РТГА применяют для установления типа и подтипа вируса, т.е. специфичности, а также для определения нарастания титров специфических антител. Постановка РТГА включает следующие этапы: приготовление взвеси эритроцитов, определение гемагглютинирующего титра антигена в реакции гемагглютинации (РГА) и рабочей дозы вируса, постановка самой реакции. Для постановки реакции необходимы следующие ингредиенты:

– исследуемый антиген (вакцина, вируссодержащая жидкость – аллантоисная или культуральная);

– иммунные сыворотки к различным типам (А и В) и субтипам типа А вируса гриппа;

– фосфатный буферный раствор pH 7,2 ± 0,2 (ФБР);

– суспензия куриных эритроцитов, 1 %.

1. Приготовление взвеси куриных эритроцитов. Для постановки РТГА используют эритроциты петухов. Кровь у петухов берут из сердца или подкрыльцевой вены.

Свежеполученную кровь от 3 – 5 петухов помещают во флакон со стеклянными бусами или с одним из антикоагулянтов (раствор Альсевера,

5 % раствор натрия цитрата). Дефибринирование крови проводят немедленно путем интенсивного встряхивания флакона в течение 5 – 7 мин при температуре (20 ± 2) °С до выпадения волокон фибрина.

Дефибринированную кровь фильтруют через 4 слоя марли, затем трехкратно отмывают ФБР путем центрифугирования при 1500 об/мин в течение 5 мин или 800±200 об/мин в течение (15±5) мин». Надосадочную жидкость удаляют. Из осадка, принимаемого за 100 %, готовят 1 % суспензию куриных эритроцитов по объему.

2. Определение гемагглютинирующего титра антигена. В лунках агглютинационнного планшета готовят двукратные разведения антигена в объеме 0,4 мл на фосфатном буферном растворе, начиная с 1:10 до 1:1280. В

каждую лунку вносят по 0,4 мл 1 % суспензии эритроцитов. Содержимое лунок перемешивают встряхиванием планшета и оставляют при температуре (20 ± 2) °С на 40 – 45 мин (до оседания эритроцитов в контроле).

Реакцию оценивают по «четырехкрестовой» системе. За титр антигена, или одну агглютинирующую единицу (АЕ), принимают наибольшее разведение антигена, дающее четко выраженную агглютинацию эритроцитов (+++ или ++++).

Определение титра антигена сопровождается отрицательным контролем на отсутствие спонтанной агглютинации эритроцитов. С этой целью в контрольную лунку того же агглютинационнного планшета вносят 0,4 мл фосфатного буферного раствора и 0,4 мл 1 % суспензии эритроцитов. При отсутствии спонтанной агглютинации на дне лунки выпадает гомогенный с ровными краями осадок эритроцитов (отрицательная реакция).

3. Приготовление рабочей дозы антигена. В РТГА рабочей дозой антигена является то разведение антигена, в 0,2 мл которого содержится 4 агглютинирующие единицы (4 АЕ). Для вычисления ее следует установленную величину титра антигена разделить на 8. Полученная от деления цифра указывает во сколько раз нужно развести антиген, чтобы в 0,2 мл его содержалось 4 АЕ (рабочая доза).

Перед постановкой основного опыта проверяют точность приготовления рабочей дозы (4 АЕ). Для этого в пять лунок горизонтального ряда плексигласового планшета, начиная со второй, вносят по 0,2 мл фосфатного буферного раствора. В 1-ю и 2-ю лунки добавляют по 0,2 мл приготовленной рабочей дозы антигена. После перемешивания переносят 0,2 мл смеси из лунки в лунку, начиная со 2-й по 5-ю лунку, из 5-й лунки 0,2 мл удаляют. Затем в каждую лунку добавляют по 0,2 мл фосфатного буферного раствора и по 0,4 мл 1 % суспензии куриных эритроцитов. В 6-й лунке ставят контроль на отсутствие спонтанной агглютинации эритроцитов. После

встряхивания смесь оставляют при температуре (20 ± 5) °С на 40–45 мин (до оседания эритроцитов в контроле).

При правильном выборе рабочей дозы полная (++++) агглютинация эритроцитов должна наблюдаться только в первых трех лунках. В 4-й и 5-й лунках агглютинация должна отсутствовать. В случае отклонения от указанного выше, разведение антигена должно быть изменено путем добавления соответствующего количества антигена или фосфатного буферного раствора для получения необходимой рабочей дозы. При этом необходимо повторно проверить правильность приготовления рабочей дозы.

4. Постановка реакции торможения гемагглютинации. Для удаления неспецифических ингибиторов гемагглютинации перед постановкой РТГА сыворотки необходимо обработать нейраминидазой холерных вибрионов или RDE-реагентом (Примечания).

После удаления неспецифических ингибиторов готовят двукратные разведения сывороток в лунках плексигласовой доски, начиная с 1:10 до 1:640 и выше в объеме 0,2 мл. К каждому разведению сыворотки добавляют по 0,2 мл рабочей дозы антигена (4 АЕ). Смесь встряхивают и после контакта антигена и сыворотки (от 30 мин до 1 час) при температуре (20 ± 2) °С в каждую лунку добавляют по 0,4 мл 1 % суспензии куриных эритроцитов. Смесь повторно встряхивают, оставляют при температуре (20 ± 2) °С в течение 40 – 45 мин (до оседания эритроцитов в контроле), после чего производят учет результатов реакции.

При наличии в сыворотке специфических антител наступает задержка агглютинации эритроцитов. За титр сыворотки принимают предельное разведение, вызывающее полную задержку гемагглютинации.

Задержка гемагглютинации указывает на соответствие типа антигена и взятой сыворотки; отсутствие задержки гемагглютинации свидетельствует о несоответствии типа взятой сыворотки антигену.

Примечания

1. Удаление неспецифических ингибиторов гемагглютинации из иммунных сывороток с помощью нейраминидазы холерных вибрионов или RDE-реагентом. При наличии инструкции по применению коммерческого реактива необходимо следовать требованиям, изложенным в данном документе.

Метод основан на способности нейраминидазы холерных вибрионов, не действуя на специфические антитела, разрушать ингибиторы гемагглютинации к вирусам гриппа А и В в сыворотках крови человека, кур, крыс, кролика.

Добавить к 1 объему сыворотки 3 объема реагента нейраминидазы. К смеси, состоящей из 0,1 мл сыворотки и 0,3 мл реагента нейраминидазы, добавляют 0,6 мл фосфатного буферного раствора, чтобы получить разведение сыворотки 1:10. Смесь инкубируют при температуре (37 ± 2) °С в течение 18 – 20 час и затем прогревают при температуре (56 ± 2) °С в течение 30 мин.

Сыворотка, обработанная нейраминидазой, может быть использована для РТГА в течение 2 недель при условии ее хранения при температуре (5 ± 1) °С.

2. Приготовление 0,1 М раствора фосфатного буферного (pH 7,2 ± 0,2).

Раствор 1. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 17,8 г натрия фосфата двузамещенного 2 – водного ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$), растворяют в 500 мл воды очищенной, доводят объём раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Раствор 2. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 15,6 г натрия фосфата однозамещённого 2–водного ($NaH_2PO4 \cdot 2H_2O$), растворяют в 500 мл воды очищенной, доводят объём раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносят 720 мл раствора 1, прибавляют 280 мл раствора 2 и перемешивают. Затем в мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 100 мл приготовленного 0,1 М фосфатного буферного раствора доводят объём раствора водой очищенной до метки, перемешивают, прибавляют 8,5 г натрия хлорида и вновь перемешивают. pH полученного раствора должен быть 7,2 ± 0,02. Если показатель pH выше или ниже требуемого, его соответственно доводят 1 М раствором хлористоводородной кислоты или 1 М раствором натрия гидроксида.

Приготовление раствора Альсевера

Состав:

– 2,05 % глюкозы;
– 0,42 % натрия хлорида;
– 0,8 % натрия цитрата;
– 100,0 мл воды очищенной.

pH раствора доводят с помощью 5 % раствора лимонной кислоты до pH 5,6 (примерно 10 мл 5 % раствора лимонной кислоты на 1 л раствора Альсевера). Раствор стерилизуют фильтрацией или автоклавированием в течение 3 последовательных дней при температуре 100 °С и давлении 0,7 атм. Для консервирования добавляют на 1 мл крови 1,2 мл раствора Альсевера. В данном растворе эритроциты могут храниться при температуре (4 ± 2) °С в течение 1–2 нед. Перед использованием эритроциты необходимо трехкратно отмыть фосфатным буферным раствором с помощью центрифугирования при (800 ± 200) об/мин в течение 10 мин.

3. Приготовление консервирующего 5 % раствора натрия цитрата.

5 % раствор натрия цитрата перед использованием разводят в 2 раза 0,1 М фосфатным буферным раствором (pH 7,2 ± 0,2). К одной части полученного раствора натрия цитрата добавляют 2 части крови петухов. В данном растворе эритроциты могут храниться при температуре (4 ± 2) °С в течение 3 – 5 сут.

Метод постановки РТГА с вирусом гриппа (микрометод). Принцип метода, его учет и ингредиенты, те же, что и для проведения РТГА макрометодом. Отличие методов заключается в изменении концентрации и объемов ингредиентов.

Реакцию ставят в микропланшетах с «U»-образными лунками.

1. Приготовление 0,5 % взвеси куриных эритроцитов. Взвесь готовят из 1 % суспензии эритроцитов (см. макрометод) разведением ее в 2 раза фосфатным буферным раствором.

2. Определение гемагглютинирующего титра антигена. В каждую лунку микропланшета одного ряда вносят фосфатный буферный раствор в объеме 50 мкл. Затем в первую лунку вносят 50 мкл антигена в разведении 1:10 и далее проводят титрование по принципу двукратного разведения. Из последней лунки удаляют 50 мкл. Затем в каждую лунку вносят по 50 мкл 0,5 % суспензии эритроцитов. Содержимое лунок перемешивают встряхиванием и оставляют при комнатной температуре на 40–45 мин до оседания эритроцитов в контроле.

Реакцию оценивают по «четырехкрестовой» системе. За титр антигена, или одну агглютинирующую единицу (АЕ), принимают наибольшее

разведение антигена, дающее четко выраженную агглютинацию эритроцитов (+++ или ++++).

Определение титра антигена сопровождается постановкой отрицательного контроля на отсутствие спонтанной агглютинации эритроцитов. В качестве отрицательного контроля служат несколько лунок панели, в которые вместо антигена внесен фосфатный буферный раствор.

3. Приготовление рабочей дозы антигена. Рабочая доза антигена при постановке РТГА микрометодом равна 8 АЕ. Для её расчета и последующего приготовления гемагглютинирующий титр делят на 16. Полученное значение указывает во сколько раз необходимо развести антиген.

Пример: титр антигена равен 160. Разделив 160 на 16, получаем цифру 10, указывающую на то, что антиген необходимо развести в 10 раз.

Перед постановкой основного опыта проверяют точность приготовления рабочей дозы (8 АЕ). Для этого в шесть лунок микропланшета, начиная со второй, вносят по 25 мкл фосфатного буферного раствора. В 1 и 2 лунки добавляют по 25 мкл приготовленной рабочей дозы антигена. После перемешивания 25 мкл смеси переносят из 2 лунки в 3, из 3 – в 4 и т.д. Из последней лунки панели 25 мкл удаляют. Затем во все лунки добавляют по 25 мкл фосфатного буферного раствора и по 50 мкл 0,5 % суспензии эритроцитов. После встряхивания смесь оставляют при температуре (20 ± 5) °С на 40 – 45 мин до оседания эритроцитов в контроле.

При правильном выборе рабочей дозы агглютинация эритроцитов должна наблюдаться только в четырех лунках микропланшета. В остальных лунках агглютинация должна отсутствовать. В случае отклонения от указанного результата добавляют антиген или фосфатный буферный раствор для получения необходимой рабочей дозы.

4. Постановка реакции торможения гемагглютинации. Метод постановки реакции микрометодом соответствует таковому, описанному для макрометода, за исключением объемов используемых ингредиентов реакции.

Готовят двукратные разведения сыворотки в объеме 25 мкл, вносят рабочую дозу антигена (8 АЕ) в объеме 25 мкл и после контакта антигена и сыворотки (от 30 мин до 1 ч) при температуре (20 ± 2) °С в каждую лунку панели вносят по 50 мкл 0,5 % взвеси эритроцитов. После оседания эритроцитов в контроле (как правило, через 40 – 45 мин) проводят учет результатов (макрометод).

За титр сыворотки принимают величину обратную ее разведению, при котором отсутствует агглютинация эритроцитов.

Прозрачность. Должен выдерживать сравнение с эталоном III. Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Цветность. Интенсивность окраски раствора не должна быть более эталона Y_5. Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH. От 7,0 до 7,6. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Герметизация. Ампулы и флаконы должны быть герметичны. Определение проводят в соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Белок. Не более 100 мкг на дозу для цельновирионных и расщепленных вакцин для каждого из входящих в состав вакцины штамма. Не более 40 мкг на дозу для субъединичных вакцин за вычетом

количественного содержания гемагглютинина для каждого из входящих в состав вакцины штамма. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение белка» по методу Лоури, если нет других указаний в нормативной документации.

Стерильность. Должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Бактериальные эндотоксины. Не более 100 ЕЭ/доза. Определение проводят методом гель-тромб теста в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины». Чувствительность используемого ЛАЛ-реактива должна быть указана в нормативной документации.

Пирогенность. Должен быть апирогенным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Тест-доза - 0,1 мл вакцины на кг массы кролика. В нормативной документации могут быть указаны иные тест-дозы. Проведение теста не требуется при определении бактериальных эндотоксинов (методы являются взаимозаменимыми).

Аномальная токсичность. Должен быть нетоксичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Доза для мышей и морских свинок 0,5 мл внутрибрюшинно. В нормативной документации могут быть указаны иные тест-дозы.

Специфическая безопасность. Не должен содержать живого вируса гриппа.

Определение отсутствия живого вируса проводят путем заражения 10 куриных эмбрионов (10–12-дневных) по 0,2 мл препарата в аллантоисную полость. Через 48 – 72 ч (в соответствии с паспортом на производственный штамм, принимая во внимание максимальное время экспозиции) инкубации эмбрионов в термостате при температуре 34 – 37 °С (в соответствии с паспортом на производственный штамм, принимая во внимание максимальную температуру инкубации) аллантоисную жидкость проверяют на наличие гемагглютинина с эритроцитами петухов (1 % суспензия). Не

менее 7 из 10 куриных эмбрионов должны остаться живыми. Собирают по 0,5 мл аллантоисной жидкости из каждого эмбриона, объединяя жидкость от всех эмбрионов. Затем заражают по 0,2 мл неразведенной смеси аллантоисной жидкости 10 эмбрионов. Эмбрионы инкубируют при тех же условиях, после чего определяют наличие гемагглютининов аллантоисной жидкости после второго пассажа. Результаты реакции после 2-го пассажа должны быть отрицательными. В том случае, если определяется наличие гемагглютининов в аллантоисной жидкости после 2-го пассажа, допускается проведение 3-го пассажа. Результаты реакции после 3-го пассажа должны быть отрицательными.

Специфическая активность. Должен содержать гемагглютинин вируса гриппа подтипов типа А и типа В не более 15 ± 2 мкг на дозу. Требование к количественному содержанию гемагглютинина в дозе формулируют на основании результатов клинических испытаний по иммуногенности. Специфическую активность определяют в реакции одиночной радиальной иммунодиффузии (ОРИД).

Принцип метода. Гемагглютинин (ГА), диффундируя из лунок агарозного геля в радиальном направлении, реагирует со специфическими антителами сыворотки, находящейся в агарозе, и образует в геле зону преципитации. Размеры окружающей лунку зоны преципитации находятся в прямой зависимости от количества антигена, внесенного в лунку. Методика определения должна быть приведена в нормативной документации.

В ОРИД может быть использован международный стандарт моноспецифической сыворотки к гемагглютинину вируса гриппа производства NIBSC (Великобритания) или TGA (Австралия) и может быть использован международный стандарт гемагглютинина вируса гриппа производства NIBSC или TGA.

Определение специфической активности вакцин, т.е. определение содержания антигена, гемагглютинина (ГА) в мкг/мл, проводят на двух

пластинах. На каждой пластине исследуют стандарт и серии вакцины, отводя под каждый образец по два ряда лунок. На второй пластине проверяют те же образцы, но расположение вакцин и стандарта произвольно меняют. Предварительно готовят 500 мкл смеси детергента и антигенов, состоящей из (50 мкл детергента и 450 мкл антигена) и далее, смесь инкубируют при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем готовят разведения антигенов: неразведенный антиген, 0,75, 0,5 и 0,25 мкл (или в соотношении: 1:0, 3:1, 1:1, 1:3), используя для разбавления ФБР (табл.).

Таблица – Схема разведений антигена

Разведение	Соотношение	Объем в мкл	
		Антиген	Растворитель
неразвед.	1:0	100	0
0,75	3:1	150	50
0,5	1:1	100	100
0,25	1:3	100	300

Вакцина и стандартный антиген должны содержать близкие количества ГА, так, чтобы размеры зон преципитации могли быть сравнимы. Поэтому, если вакцина, согласно паспортным данным, содержит меньше ГА, чем стандарт, необходимо провести предварительное разведение стандарта и, наоборот: в случае, если стандарт менее активен, чем вакцина, то делают разведение разводится вакцинаы. В документации на стандарт должны быть указаны рекомендуемые разведения стандарта и сыворотки.

Результаты анализа. Рассчитывают квадраты диаметров колец преципитации каждого антигена на основании средних величин по двум пластинам и строят график, откладывая по оси ординат квадраты диаметров, а по оси абсцисс – разведения антигенов. На графике зависимость квадрата диаметров от разведений для каждой вакцины должна быть выражена прямой

линией, которая должна располагаться по оси ординат в пределах 3 мм² от стандартной кривой. Если расстояние между начальными точками тестируемого и стандартного антигена превышает 3 мм², такие результаты не учитывают; в этом случае необходимо более точно подобрать концентрации антисыворотки и антигенов. Затем на оси ординат между начальными точками кривой стандарта и каждого антигена находят среднюю точку, от нее проводят прямую, параллельную оси абсцисс, а от нее на уровне разведения 1:3 находят расстояния до кривой тестируемого антигена и стандартного. Количество ГА (Х) в вакцине в мкг/мл рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{L_x}{L_{\text{СТ}}} \cdot a \cdot b,$$

где: L_x, L_{cm} – расстояния по перпендикуляру на уровне разведения 1:0 от срединной линии до пересечения с кривыми тестируемого и стандартного антигенов, соответственно;

a – содержание ГА в мкг/мл в стандарте;

b – предварительное разведение вакцины

Учет результатов ОРИД можно проводить, используя программное обеспечение. Методика должна быть валидирована.

Примечания

Приготовление моноспецифической сыворотки к ГА. Делают разведение водой очищенной до объема, указанного на ампуле; последующие разведения делают с помощью ФБР.

Приготовление стандартного антигена. Делают разведение водой в объеме, указанном на ампуле; дальнейшие разведения делают с помощью ФБР. Разведенный антиген хранят при температуре 4 °С не более 6 ч.

Приготовление агарозы. Агарозу заливают ФБР (конечная концентрация 1,5 %) и нагревают в кипящей водяной бане до полного растворения. Расплавленную агарозу фильтруют в горячем виде через ватно-марлевый фильтр, разливают по 12 мл в пробирки и закрывают резиновыми пробками. В таком виде агароза может храниться более 3 мес. при комнатной температуре (если агароза начинает отделяться от стенок пробирки, ее не используют).

Детергенты. Используют детергенты, указанные в паспорте (инструкции) к стандарту. Растворы детергентов готовят на воде очищенной и хранят при комнатной температуре в течение 6 мес.

Краситель. Готовят 0,3 % раствор кислотного синего 83 (Кумасси бриллиантовый синий Р250) в растворе для обесцвечивания гелей. Краситель хранят при комнатной температуре и может использоваться до выпадения в осадок образовавшихся кристаллов красителя.

Раствор для обесцвечивания окрашенных агарозных гелей. В мерный цилиндр вместимостью 1 л вносят 200 мл уксусной кислоты ледяной, добавляют 500 мл этилового спирта, перемешивают, доводят объем раствора до метки и вновь перемешивают. Раствор хранят неограниченное время в емкости с притертой пробкой.

Вещества, вносимые в препарат. Выполняются тесты определения содержания соответствующих химических и вспомогательных веществ, указанных в нормативной документации, используемых для разрушения вируса и его инактивации.

Все исходные материалы и сырье, используемые при производстве, должны иметь сертификаты соответствия (допустимо только фармакопейное качество используемых компонентов). В состав вакцины должны входить вспомогательные компоненты, разрешенные к медицинскому применению в дозах не вызывающих токсические, аллергические или иные нежелательные реакции у человека.

Тиомерсал. От 42,5 до 57,5 мкг на дозу. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение тиомерсала в биологических лекарственных препаратах».

Овальбумин. Не более 1 мкг на дозу. Определение проводят иммуноферментным методом анализа с тест–системой для количественного определения овальбумина в жидкости. Чувствительность используемой тест-системы и условия проведения анализа указывают в нормативной документации.

Иммуногенность. Контролируют три первые серии вакцины, содержащие новый вакцинный штамм, по данным исследования в РГГА

парных сывороток добровольцев, полученных до иммунизации и после нее по методу, описанному в разделе «Подлинность».

Для оценки иммуногенности должны быть взяты парные сыворотки (до вакцинации и через 21-28 дней после вакцинации). Обе сыворотки титруют одновременно в РТГА с эритроцитами петуха (раздел «Подлинность»). Титр в РТГА менее 1:10 оценивается как 1:5.

Показатели иммуногенности для серонегативных (с исходным титром не более 1:20):

– Число лиц с четырехкратным и более увеличением титра антител (сероконверсия) должно быть > 40 %;

– Увеличение среднегеометрического титра (кратность нарастания) > 2,5 раза;

– Процент лиц с защитным титром антителом ≥ 40 должно быть > 70 %.

По крайней мере, один показатель должен отвечать вышеуказанным требованиям.

Каждую серию вакцины испытывают на группе из 30 человек в возрасте от 18 лет. Ввиду малочисленности групп лиц вакцинированных каждой серией вакцины при замене штамма в учет результатов могут быть включены серопозитивные лица (с титром антител ≥ 40).

Реактогенность. Вакцина должна быть ареактогенной или слабо реактогенной. Контролируют три первые серии вакцины, содержащей новый вакцинный штамм. Каждую серию вакцины испытывают на той же группе людей численностью 30 человек в возрасте от 18 лет, на которой определяют иммуногенность.

У части привитых могут наблюдаться местные и общие реакции различной степени выраженности; гиперемия, болезненность, припухлость в месте введения; недомогание, головная боль, повышение температуры. Местные реакции должны исчезать в течение от 1 до 3 суток (очень редко –

до 5 сут), общие – в течение 3 сут. Допустимые реакции и их количество определяют для каждого конкретного препарата по результатам клинических исследований.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты». Вторичная (потребительская) упаковка кроме общепринятых требований, должна содержать сведения о субстрате культивирования, составе штаммов, эпидсезоне, для которого предназначен препарат, количестве гемагглютинина каждого штамма в дозе, наличие или отсутствие консерванта либо его остаточное количество.

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С в сухом месте. Замораживание не допускается.

Вакцина для профилактики гепатита А культуральная, очищенная концентрированная адсорбированная инактивированная жидкая	ФС.3.3.1.0029.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину для профилактики гепатита А культуральную, очищенную концентрированную адсорбированную инактивированную жидкую, предназначенную для профилактики гепатита А, которая представляет собой суспензию инактивированных вирионов вируса гепатита А (ВГА), выращенных на разрешенной для производства вакцин культуре перевиваемых клеток, очищенных, концентрированных и адсорбированных на геле алюминия гидроксида.

Готовую форму вакцины выпускают в жидком виде в ампулах для внутримышечного введения.

Препарат предназначен для профилактики вирусного гепатита А у взрослых (доза 1 мл) и детей (доза 0,5 мл).

ПРОИЗВОДСТВО

Для производства вакцины против гепатита А используют штамм вируса гепатита А (ВГА), адаптированный к перевиваемой культуре клеток. Производственный штамм вируса является исходным для приготовления посевного вируса. Его хранят в ампулах при температуре минус (20 ± 2) °С с ежегодной проверкой инфекционного титра и антигенной активности.

Производственный штамм должен быть депонирован.

Производственный штамм контролируется не реже 1 раза в год.

Посевной вирус получают путем заражения производственным штаммом перевиваемой культуры клеток. Посевным вирусом может служить сбор 1-го и 2-го пассажа производственного штамма в указанной выше культуре. Сбор вируса осуществляют на 21 сут инкубации зараженной культуры клеток при температуре (37 ± 2) °С. Зараженные клетки собирают в 0,01 М фосфатно-солевом буферном растворе, pH (7,6 ± 0,2), пятикратно замораживают при температуре минус (20 ± 2) °С, оттаивают при температуре (18 ± 2) °С.

Посевной вирус должен быть свободным от контаминации бактериями (в том числе микоплазмами), грибами и посторонними вирусами; должен обладать антигенной специфичностью и репродуктивной активностью. Инфекционный титр вируса должен быть не ниже $10^{5,5}$ $ТЦД_{50}$/мл при заражении перевиваемой культуры клеток. Посевной вирус хранят при температуре не выше минус (20 ± 2) ^{0}С с ежегодным контролем его инфекционного титра.

Состав на 1 мл (1 прививочная доза для взрослых), если нет других указаний в нормативной документации:

- инактивированный антиген вируса гепатита А – не менее 320 ИФА единиц;
- алюминия гидроксид – от 0,35 до 0,65 мг;
- формальдегид – не более 0,15 мг;
- 0,01 М фосфатно-солевой буферный раствор – до 1 мл.

В состав вакцины 0,5 мл (1 прививочная доза для детей) входят все компоненты, указанные для взрослой формы, с уменьшенной нормой в 2 раза.

Вакцина не содержит консервантов и антибиотиков.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Слегка опалесцирующая суспензия, при отстаивании разделяющаяся на прозрачную, бесцветную жидкость и осадок белого цвета, легко разбивающийся при встряхивании, без образования хлопьев и посторонних

включений.

Подлинность. Препарат должен быть идентичным антигену вируса гепатита А и должен индуцировать у мышей образование антител к вирусу гепатита А (ВГА), наличие которых определяют в соответствии с ОФС «Метод иммуноферментного анализа» с помощью коммерческих тест-систем для выявления антител к вирусу гепатита А.

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Проходимость через иглу. Гомогенная взвесь, диспергированная путем встряхивания, должна свободно проходить в шприц через иглу 0,8· 40, если нет иных указаний в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Суспензии».

Время седиментационной устойчивости. Суспензия, образующаяся при встряхивании, не должна расслаиваться в течение не менее 5 мин. Определение проводят визуально в соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

pH. От 7,0 до 7,6. Испытания проводятся потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Стерильность. Препарат должен быть стерилен. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность. Препарат должен быть апирогенным. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность».

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичным. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

Специфическая активность. Испытания проводят путем определения содержания вирусного антигена гепатита А методом иммуноферментного анализа (ИФА) или по иммуногенной активности вакцины биологическим методом.

Определение содержания вирусного антигена гепатита А (АГ ВГА)

Содержание вирусного антигена должно быть не менее 320 ИФА единиц в 1 дозе вакцины для взрослых и не менее 160 ИФА единиц в 1 дозе вакцины для детей; определение проводят методом ИФА с использованием коммерческих тест-систем для выявления антигена ВГА. Определение содержания антигена ВГА в вакцине проводят параллельно с определением содержания антигена в стандартном образце (СО) вакцины. Отношение содержания АГ ВГА в 1 дозе вакцины к содержанию АГ ВГА в СО должно находиться в пределах от 0,66 до 1,66 при статистической обработке результатов методом параллельных линий. Постановку контроля осуществляют в соответствии с инструкцией по применению используемой тест-системы.

Перед постановкой ИФА проводят предварительную десорбцию АГ ВГА с алюминием гидроксида, центрифугируя 1000 мкл испытуемого образца вакцины и СО при 6000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре.

Из 900 мкл надосадочной жидкости готовят ряд последовательных двукратных разведений от 1:2 до 1:4 и осуществляют постановку ИФА с определением титра АГ ВГА в надосадочной жидкости (расчет N_1).

Осадок растворяют в 900 мкл буферного раствора для десорбции, тщательно перемешивают и оставляют на ночь при температуре от 2 до 8 °С. Затем центрифугируют при 6000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре. Из надосадочной жидкости готовят ряд последовательных двукратных разведений от 1:2 до 1:64 и определяют титр АГ ВГА методом ИФА (расчет N_2).

Расчет N_1 и N_2 осуществляют по формуле:

$$N=(T\cdot V_1)\ V_2,$$

где N – расчетное количество ИФА единиц в 1 мл готовой формы вакцины;

T – обратная величина титра антигена ВГА в ИФА;

V_1 – объем 1 дозы вакцины, мкл;

V_2 – объем исследуемого образца в ИФА, мкл.

Суммарное содержание антигена ВГА в вакцине (N_1 и N_2) должно быть не менее 320 ИФА единиц в 1 дозе вакцины для взрослых и не менее 160 ИФА единиц в 1 дозе вакцины для детей.

Примечание

Приготовление буферного раствора для десорбции. В градуированную посуду вместимостью 50 мл помещают 50 мг желатина, 7,16 г натрия фосфорнокислого двузамещенного, 55 мг трилона Б (ЭДТА), 50 мкл твина-20 и растворяют в 40 мл воды очищенной, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре не более 1 мес.

Определение иммуногенной активности ВГА

Вакцина должна индуцировать образование антител к вирусу гепатита А у однократно иммунизированных белых нелинейных мышей (самцов) массой 18 – 20 г. Определение содержания антител к ВГА в сыворотке крови мышей проводят методом ИФА с определением $ИД_{50}$, которая должна составлять не менее 6. В качестве образца сравнения используют СО вакцины. Отношение $ИД_{50}$ в испытуемой вакцине к $ИД_{50}$ в СО должно находиться в пределах от 0,33 до 3 (P = 0,95) при статистической обработке результатов методом параллельных линий.

Метод основан на определении дозы вакцины, способной вызвать образование антител к вирусу гепатита А у 50 % мышей.

Для проведения теста готовят серию разведений испытуемого образца и СО вакцины от 1:2 до 1:32. Для разведения используют плацебо, в состав которого входит 0,01 М фосфатно-солевой буферный раствор (pH 7,0 –7,6) и гель алюминия гидроксида в концентрации от 0,35 до 0,65 мг/мл (по Al^{+3}). Методом случайной выборки формируют опытные и контрольную группы по 10 мышей в каждой. Дополнительно 10 мышей оставляют интактными. Количество опытных групп должно соответствовать количеству используемых разведений.

Мышам опытных групп вводят разведения вакцины в объеме 1 мл подкожно в 2 точки, используя 1 разведение препарата на 1 опытную группу. Мышам контрольной группы по той же схеме и тем же способом вводят пла-

цебо.

Через 28 – 30 дней животных обескровливают и готовят сыворотку. Каждый полученный образец сыворотки тестируют на наличие антител к вирусу гепатита А, используя коммерческие иммуноферментные тест-системы для выявления антител к вирусу гепатита А. Постановку и учет результатов осуществляют в соответствии с инструкцией по применению тест-системы.

Результаты контроля учитывают, если все образцы сывороток интактных и контрольной групп мышей идентифицированы как отрицательные. В этом случае расчет $ИД_{50}$ осуществляют по результатам, полученным в опытных группах, по методу Кербера в соответствии с формулой:

$$\lg ИД_{50} = \lg D_N - \delta\,(\Sigma\,Li - 0{,}5),$$

где: D_N – максимальная величина вводимой дозы;

$\lg D_N$ – десятичный логарифм отношения каждой последующей дозы к предыдущей (десятичный логарифм кратности испытанных разведений);

Li – отношение числа иммунных животных к числу всех вакцинированных животных конкретными разведениями;

Σ Li – сумма всех значений L.

$$ИД_{50} = \text{anti}\lg\,(-\lg ИД_{50}),$$

где: $ИД_{50}$ – разведение вакцины, вызывающее выработку антител у 50 % животных.

Полнота сорбции антигена. Количество несвязанного антигена ВГА в вакцине должно быть не более 6 % от общего количества антигена ВГА. Образец вакцины (1000 мкл) и СО центрифугируют при 6000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре. Содержание несвязанного антигена определяют в надосадочной жидкости методом ИФА с использованием коммерческих тест-систем для определения антигена ВГА в соответствии с инструкцией по применению и выражают в процентах от общего количества антигена ВГА.

Формальдегид. Не более 0,15 мг/мл. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение формальдегида в биологических

лекарственных препаратах».

Алюминия гидроксид. От 0,35 до 0,65 мг/мл (в пересчёте на Al^{+3}). Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение ионов алюминия в сорбированных биологических лекарственных препаратах».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Дополнительная информация: указывается состав на 1 мл (1 прививочная доза для взрослых).

Наносятся предупредительные надписи: «Перед употреблением встряхивать», «Хранить в не доступном для детей месте», «Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений», «Не замораживать».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С. Не замораживать.

Вакцина жёлтой лихорадки живая сухая, лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения	ФС.3.3.1.0030.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину жёлтой лихорадки живую сухую, лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения, представляющую собой лиофилизированную очищенную центрифугированием тонкоизмельченную ткань куриных эмбрионов, свободных от специфической патогенной микрофлоры (specific pathogen free – SPF), зараженных аттенуированным штаммом 17Д вируса желтой лихорадки.

Вакцина предназначена для профилактики желтой лихорадки.

Вакцина не содержит консервантов и антибиотиков.

ПРОИЗВОДСТВО

Для приготовления вакцины применяется культивирование вируса в куриных эмбрионах, свободных от специфической патогенной микрофлоры (SPF). Куриные эмбрионы должны быть получены из сертифицированных хозяйств.

Производство вакцины желтой лихорадки должно быть организовано при соблюдении условий установленных требований организации производства и контроля качества лекарственного препарата, гарантирующих качество и безопасность для человека. В соответствии с требованиями ВОЗ, должна строго выполняться система посевных серий, должно соблюдаться строгое ограничение количества пассажей вируса в процессе приготовления вакцины (не более 2 пассажей от основного посевного вируса).

Для получения готовой лекарственной формы вакцины перед лиофилизацией в препарат добавляют (содержание расчётное) вспомогательные вещества, повышающие стабильность вакцины (стабилизаторы) при хранении и транспортировании в течение срока годности. Вспомогательные вещества поступают на производство с сертификатами качества и контролируются в соответствии с требованиями, предъявляемыми к ним нормативной документацией. Наименование и количество вспомогательных веществ (стабилизаторов) указывают в нормативной документации.

В состав препарата не должны вноситься в качестве стабилизатора альбумин человека или сыворотка крови человека.

Одна доза вакцины содержит: активный компонент – вирус желтой лихорадки, штамм 17Д - 1000LD_{50} или 1600 БОЕ вируса, может содержать вспомогательные вещества (содержание расчетное) предусмотренные нормативной документацией.

Производственный штамм. Аттенуированный штамм 17Д вируса желтой лихорадки.

Первичная посевная серия № 213/77 в лиофилизированной форме предоставляется референс-лабораторией ВОЗ. Условия хранения при температуре минус 70 ^{0}С.

Вторичную посевную серию (рабочий посевной вирус) готовят из первичной посевной серии, которая представляет собой лиофилизированную суспензию тонкоизмельчённой ткани куриных эмбрионов, свободных от специфической патогенной микрофлоры. Вторичную посевную серию производственного штамма получают в условиях одного производственного цикла, т.е. однократного пассирования первичной посевной серии вируса.

Вторичная посевная серия штамма 17Д применяемая непосредственно для получения вакцины, должна быть аттестована и соответствовать следующим требованиям: быть стерильной; обладать специфической активностью, определяемой в одной из культур клеток: первично-трипсинизированных

фибробластах эмбрионов кур (ФЭК), или перевиваемых линиях клеток – клетки почек эмбриона свиньи (PS), или клетки почек зеленой мартышки *(Vero*); или на лабораторных животных мышах линии Balb/c или СВА 4–6 недельного возраста, массой 10–12 г; титр вируса должен быть не менее 10000 LD50/мл при испытании на мышах или 16000 БОЕ/мл при испытании в культуре клеток; должна быть подлинной, т.е. нейтрализоваться специфической иммунной сывороткой к вирулентному штамму «Дакар» вируса желтой лихорадки с индексом нейтрализации не менее 1,0 lg; должна быть специфически безопасной при заражении обезьян *Macaca mulatta* (макака резус) или *Macaca fascicularis* (макака циномольгус) или другого вида обезьян чувствительного к вирусу желтой лихорадки. Обезьяны не должны иметь в крови вируснейтрализующих антител к вирусу желтой лихорадки до введения посевного вируса.

Вторичная посевная серия должна быть не токсичной для мышей и морских свинок (раздел «Аномальная токсичность»).

При параллельном испытании препарата сравнения – первичной посевной серии должны быть получены аналогичные результаты.

При изготовлении новых вторичных посевных серий (рабочий посевной вирус) необходимо подтверждение генетической стабильности методом сиквенирования.

Производственный штамм – вторичный посевной вирус должен храниться в лиофилизированном виде при температуре минус 70 ^{0}С.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Пористая масса светло-розового цвета, гигроскопична. Испытание проводят визуально.

Восстановленный препарат – опалесцирующая жидкость желтовато – розового цвета.

Подлинность. Аттенуированный вирус жёлтой лихорадки, штамм 17Д, содержащийся в вакцине, должен нейтрализоваться специфической иммун-

ной сывороткой к штамму «Дакар» вируса жёлтой лихорадки. Индекс нейтрализации не менее 1,0 lg.

Определение проводят биологическим методом в реакции нейтрализации в одной из культур клеток: первично-трипсинизированные фибробласты эмбрионов кур (ФЭК); перевиваемой культуре клеток почек эмбрионов свиньи (PS); перевиваемой культуре клеток почек зеленой мартышки (*Vero*) или в реакции биологической нейтрализации на мышах линий Balb/c или СВА 4–6 недельного возраста массой 10–12 г (если в нормативной документации нет иных указаний).

Постановка реакции нейтрализации в культурах клеток

Приготовление смеси вируса вакцины и специфической иммунной сыворотки. Используют 2 ампулы вакцины. Содержимое ампул разводят в растворителе – вода для инъекций, содержащем 2 % сыворотки крови плодов коровы, жидкой, инактивированной при температуре 56 ±1°С в течение 30 мин (для исключения возможности присутствия ингибиторов вируса желтой лихорадки). Используют 0,5 мл растворителя на одну дозу вакцины. Восстановленную вакцину выдерживают при температуре от 18 до 25 °С в течение 15 – 20 мин. Затем содержимое двух ампул объединяют и готовят последовательные разведения вакцины 1:5 и 1:50 в растворе натрия хлорида 0,9 %, содержащем 2 % сыворотки крови плодов коровы, жидкой, инактивированной при температуре 56 ±1°С в течение 30 мин. Каждое разведение вакцины в объёме 1,0 мл смешивают с равным объёмом рабочего разведения иммунной кроличьей сыворотки к штамму «Дакар» вируса желтой лихорадки и не иммунной кроличьей сыворотки, получая, таким образом, конечные разведения вакцины 1:10 и 1:100.

Иммунная кроличья сыворотка к штамму «Дакар» вируса желтой лихорадки в рабочем разведении должна нейтрализовать 100 – 300 БОЕ в 0,1 мл вируса желтой лихорадки, штамм 17Д. В реакции нейтрализации необходимо

использовать то же разведение неиммунной кроличьей сыворотки, что и иммунной.

Смеси вирус-сыворотка выдерживают при температуре 37 ±1 °С в течение 1 ч.

Постановка реакции нейтрализации. Используют одну из указанных выше культур клеток.

Перед внесением на монослой культуры клеток смеси вирус–сыворотка, ростовую среду сливают и монослой промывают один раз раствором Эрла. Смесь вирус-сыворотка вносят в объёме 0,2 мл в каждые 3 флакона с ФЭК или в каждые 3 лунки планшетов с клетками PS или *Vero*.

Флаконы с ФЭК или планшеты с PS или *Vero* помещают в термостат при температуре 36±1 °С на 2 ч., периодически обкатывают монослой клеток смесью вирус – сыворотка путем покачивания флаконов или планшетов через каждые 15 – 20 мин.

После адсорбции вируса, на клеточный монослой наносят питательный агар, пригодный для данной культуры клеток.

Учёт результатов. Учёт результатов проводят на 5 сут при титровании в культуре клеток ФЭК или PS, или на 6–7 сут при титровании вируса в культуре клеток *Vero*. Подсчитывают количество бляшек отдельно в каждой лунке или флаконе. Затем вычисляют среднее количество бляшек из 3 лунок планшета или 3 флаконов, соответственно для каждого разведения вируса. Титр вируса с иммунной и не иммунной сыворотками подсчитывают, как описано в разделе «Специфическая активность» и выражают в десятичных логарифмах БОЕ (бляшкообразующих единиц).

Индекс нейтрализации (подлинность вируса желтой лихорадки) представляет собой разницу lg титров вируса с не иммунной сывороткой и иммунной сывороткой и должен быть не менее 1,0 lg.

Время растворения. Не более 5 мин при добавлении 0,5 мл растворителя (вода для инъекций) на одну дозу вакцины. Определение проводят визуально.

Цветность. Восстановленный препарат – жидкость желтовато-розового цвета. Определение проводят визуально в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

Прозрачность. Восстановленный препарат – опалесцирующая жидкость желтовато-розового цвета. Оптическая плотность не более 0,6. Определение проводят фотометрическим методом при длине волны 540 нм в кюветах с толщиной слоя 3 мм. В качестве контроля используют воду.

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

Потеря в массе при высушивании. Не более 2,5 %. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Белковый азот. Не более 0,25 мг/доза. Определение проводят колориметрическим методом с реактивом Несслера в соответствии с ОФС «Определение белкового азота с реактивом Несслера с предварительным осаждением белкового материала в биологических лекарственных препаратах».

Овальбумин. Не более 5,0 мкг/ доза. Определение проводят методом ИФА в соответствии с ОФС «Метод иммуноферментного анализа».

Стерильность. Должна быть стерильной. Определение проводят методом прямого посева или мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность».

Присутствие микоплазм. Не должна содержать микоплазм. Определение проводят микробиологическим методом в соответствии с ОФС «Испытание на присутствие микоплазм».

Бактериальные эндотоксины. Не более 5 ЕЭ/доза. Определение проводят методом гель-тромб тест в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

Аномальная токсичность. Должна быть нетоксична. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Тест-доза: морским свинкам – 1 доза вакцины подкожно, белым мышам по 1 дозе вакцины внутрибрюшинно.

Специфическая активность. Должна содержать в одной дозе не менее 1600 БОЕ вируса или 1000 LD_{50}. Определение проводят биологическим методом.

Определяют титр вируса в одной из культур клеток: первично-трипсинизированных фибробластах эмбрионов кур (ФЭК); перевиваемой культуре клеток почек эмбрионов свиньи (PS); перевиваемой культуре клеток почек зеленой мартышки (*Vero*) или на мышах Balb/c или СВА 4–6 недельного возраста массой 10–12 г (если в нормативной документации нет других указаний).

Для титрования используют по 3 ампулы вакцины отдельно. Содержимое каждой ампулы растворяют в растворителе (вода для инъекций), содержащем 2 % сыворотки крови плодов коровы, жидкой, инактивированной при температуре 56 $\pm$1 ^{0}С в течение 30 мин (для исключения возможности присутствия ингибиторов вируса желтой лихорадки). Используют по 0,5 мл растворителя на одну прививочную дозу. Восстановленную вакцину выдерживают при температуре 18- 20 ^{0}С в течение 15 – 20 мин. Затем проводят титрование (раздел «Подлинность»).

Каждое испытание специфической активности вакцины желтой лихорадки должно проводится с использованием стандартного образца (СО) вак-

цины желтой лихорадки, откалиброванного по Международному стандарту вакцины желтой лихорадки. Одну ампулу стандартного образца титруют три раза для подтверждения достоверности каждого количественного определения активности.

Определение специфической активности вакцины (титр в БОЕ). Определение специфической активности (титр в *БОЕ*) вакцины проводят путем титрования вируса методом бляшек в культурах клеток ФЭК, PS или *Vero*.

Готовят последовательные разведения вакцины: 1:10; 1:100; 1:000; 1:10000 в 0,9 % растворе натрия хлорида с 2 % раствором сыворотки крови плодов коровы, жидкой, инактивированной при температуре 56 $\pm$1 ^{0}С в течение 30 мин (для исключения возможности присутствия ингибиторов вируса желтой лихорадки). Каждое разведение в объёме 0,1 мл вносят в три флакона вместимостью 100,0 мл с полностью сформировавшимся монослоем клеток ФЭК или в три лунки 6-ти или 12-ти луночных планшетов с полностью сформировавшимся монослоем культур клеток *Vero* или PS.

Инфицированные клетки во флаконах или планшетах помещают на 2 ч в термостат при температуре 37 $\pm$1 ^{0}С. Через каждые 15–20 мин проводят «обкатывание» монослоя клеток вируссодержащей жидкостью путем покачивания флаконов или планшетов. По истечении периода адсорбции вируса в каждый флакон (или лунку планшета) наносят агаровое покрытие и инкубируют (раздел «Подлинность»).

Учёт результатов. Определение титра вируса желтой лихорадки проводят на 5 сут при титровании в культурах клеток ФЭК или PS, и на 6 -7 сут при титровании в культуре клеток *Vero*.

Подсчитывают количество бляшек отдельно в каждом флаконе (лунке), после чего определяют среднее количество бляшек для каждого разведения вируса и определяют концентрацию вируса в одной прививочной дозе

вакцины (0,5 мл). Титр вируса (А) выражают в бляшкообразующих единицах (БОЕ/0,5 мл) и вычисляют по формуле:

$$A = \left[\frac{(X \cdot Y)}{0{,}1}\right] \cdot 0{,}5,$$

где: X – среднее количество бляшек из 3 флаконов или 3 лунок;

Y – разведение вакцины, мл;

0,1 – объём инокулята, внесенного в один флакон или одну лунку, мл;

0,5 – объём одной дозы вакцины, мл.

Титр вируса в СО желтой лихорадки должен соответствовать аттестационному значению.

Термостабильность. Титр вируса вакцины после прогревания при температуре от 36 до 38 °С в течение 2 недель не должен снижаться более, чем на 1,0 lg и должен быть не менее 1000 LD_{50} или 1600 БОЕ в одной дозе.

Для испытания используется не менее 6 ампул вакцины от каждой испытуемой серии. 3 ампулы хранят при температуре от 2 до 8 ^{0}С в течение 2 недель, 3 ампулы подвергают воздействию температуры 37 $\pm$1 ^{0}С в течение 2 недель. Затем проводят одновременное определение титра вируса во всех 6 ампулах в одной из культур клеток ФЭК, PS, *Vero* по методике, изложенной в разделе «Специфическая активность». Разница титра вакцины не прогретой и титра вакцины прогретой составляет показатель термостабильности препарата.

Упаковка и маркировка. Определение проводят в соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Дополнительная информация: На внешней упаковке (пачке с ампулами вакцины) указывают: «Стерильно», «Препарат не содержит консервантов и антибиотиков», «Хранить в недоступном для детей месте», «Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений», «Для культивирования вируса используются куриные эмбрионы SPF – категории».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С.

Вакцина клещевого энцефалита ФС.3.3.1.0031.15
культуральная очищенная концентрированная
инактивированная жидкая сорбированная
или сухая в комплекте с растворителем алюминия гидроксида

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину клещевого энцефалита, инактивированную формальдегидом, культуральную цельновирионную очищенную концентрированную, жидкую сорбированную на минеральном сорбенте – алюминия гидроксиде, или сухую с алюминия гидроксидом в качестве растворителя. Основным активным компонентом вакцины является инактивированный антиген (протективный поверхностный белок Е) вируса клещевого энцефалита (ВКЭ).

Вакцина не содержит антибиотиков и консервантов.

Вакцина предназначена для профилактики клещевого энцефалита и для иммунизации доноров с целью получения специфического иммуноглобулина.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство вакцины клещевого энцефалита должно быть организовано при соблюдении правил организации производства и контроля качества лекарственного препарата, гарантирующих качество и безопасность для человека, а также условий работы с вирусом 2 группы патогенности (опасности) – ВКЭ.

Технология производства вакцины состоит из нескольких этапов.

1. Подготовка и ведение производственного штамма ВКЭ.

2. Подготовка и ведение первично-трипсинизированной культуры клеток куриного эмбриона (взвешенной или монослойной). В качестве субстрата для приготовления ВКЭ могут быть использованы перевиваемые клеточные линии, рекомендованные ВОЗ для этой цели, в частности, перевиваемая линия клеток *Vero*.

3. Заражение клеточной культуры, репродукция вируса и получение вирусного сбора.

4. Инактивация вирусного сбора формальдегидом, проведение очистки и концентрации вакцинного вирусного антигена, стабилизация антигена альбумином крови человека и сахарозой, получение готовой формы вакцины: сорбция жидкого антигена или его лиофилизация.

Размножение ВКЭ осуществляется на первично-трипсинизированной культуре клеток куриных эмбрионов. Куриные эмбрионы должны поступать из птицеводческих хозяйств, проверенных и аттестованных на отсутствие заболеваний птиц. Перед заражением вирусом клеточные культуры должны быть проверены на отсутствие контаминирующих агентов – вирусов, бактерий, грибов, микоплазм.

Состав. Доза вакцины содержит специфический инактивированный антиген ВКЭ – активный компонент, а также вспомогательные вещества (содержание расчетное), состав и количество которых на дозу вакцины указывают в нормативной документации предприятия.

При получении готовой формы вакцины могут применяться стабилизаторы активности очищенного концентрированного вакцинного антигена – 10 или 20 % растворы альбумина крови человека и сахароза. Перед использованием в производстве альбумин человека должен тестироваться валидированными методами на отсутствие антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, к вирусу гепатита С и поверхностному антигену вируса гепатита В (HbsAg).

Производственные штаммы и тест-штаммы

Используются производственные штаммы ВКЭ, полученные путем пассирования ВКЭ через мозг нелинейных белых мышей. Для ведения производственного штамма используется система посевных серий. Исходный лиофилизированный производственный штамм хранится при температуре не выше минус 60 ^{0} С. Исходный производственный штамм служит источником получения штаммового запаса, маточного и посевного вируса путем пассажей вируса через мозг нелинейных белых мышей.

Полученный после заражения культуральный вирусный сбор подвергается инактивации формальдегидом с последующей очисткой и концентрацией вакцинного антигена методами ультрафильтрации и/или гельхроматографии. Инактивированный вакцинный антиген контролируют на отсутствие живого ВКЭ.

При ведении штаммов на производстве должна использоваться система посевных серий, т.е. от исходного штамма до получения вирусного материала для заражения культуры клеток должно быть проведено не более 5 пассажей через мозг нелинейных белых мышей.

При приготовлении вирусного материала для получения новой серии производственного штамма ВКЭ должен проводиться контроль стерильности, биологической активности и типоспецифичности вируса.

Производственный штамм и тест-штамм ВКЭ должны отвечать следующим требованиям:

– не должны содержать контаминирующих агентов;

– индекс нейтрализации типоспецифическими иммунными сыворотками к ВКЭ в реакции нейтрализации при внутримозговом заражении нелинейных белых мышей массой 7 – 9 г, в возрасте 12 – 14 сут, не менее 1000;

– титр вируса при внутримозговом заражении нелинейных белых мышей массой 7 – 9 г возрастной категории 12 – 14 сут – не менее 8,5 lg LD_{50}/мл, при подкожном и внутрибрюшинном заражении мышей той же категории титр не менее 6,0 lg LD_{50}/мл.

Производственные лиофилизированные штаммы ВКЭ контролируются не реже 1 раза в 5 лет.

Для производства и контроля вакцины по показателю «Специфическая активность» должны использоваться вирулентные штаммы ВКЭ, выделенные из вирусофорных клещей или от больных/погибших от клещевого энцефалита людей.

Штаммы должны быть депонированы в официальной Государственной коллекции вирусов. Производственные или тест-штаммы должны быть закреплены на установленном уровне пассажей, лиофилизированы и заложены на долгосрочное хранение.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Гомогенная суспензия белого цвета без посторонних включений (для сорбированной жидкой вакцины). Пористая масса белого цвета, гигроскопична (для лиофилизированной вакцины). Определение проводят визуально.

Восстановленный препарат. Гомогенная непрозрачная суспензия белого цвета, при отстаивании разделяющаяся на бесцветную прозрачную жидкость и рыхлый осадок белого цвета. При встряхивании хлопья, конгломераты и посторонние частицы должны отсутствовать. Определение проводят визуально.

Подлинность. Должна вызывать специфический иммунитет к ВКЭ при иммунизации мышей линии Balb/c.

Определение проводят биологическим методом (раздел «Специфическая активность»).

Время растворения. Не более 3 мин (для лиофилизированной вакцины). Определение проводят визуально.

Механические включения. Должна соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в парентеральных лекарственных формах и глазных лекарственных формах».

Время седиментационной устойчивости. Суспензия, образующаяся при встряхивании, не должна расслаиваться в течение 3 мин. Определение проводят визуально.

Количественное определение антигена. Определение проводят методом иммуноферментного анализа (ИФА) в соответствии с ОФС «Метод иммуноферментного анализа» с использованием коммерческих наборов реагентов для выявления антигена ВКЭ. Проведение ИФА и учет результатов осуществляют согласно инструкции по применению набора реагентов. Титр антигена в вакцине клещевого энцефалита должен быть не менее 1:128. Методика должна быть изложена в нормативной документации. Возможно определение количества антигена ВКЭ в мкг/мл методом ИФА с помощью других валидированных наборов реагентов. Методика постановки должна быть изложена в нормативной документации.

Извлекаемый объём. Не менее номинального (для жидкой сорбированной вакцины). Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Потеря в массе при высушивании. Не более 2,0 % (для лиофилизированной вакцины). На 2 параллельных испытания отбирают 0,15 – 0,20 г испытуемого образца. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Содержание алюминия. От 0,60 до 1 мг/мл (для жидкой сорбированной вакцины).

Определение проводят методом комплексонометрического титрования в соответствии с ОФС «Определение ионов алюминия в сорбированных иммунобиологических препаратах».

Сахароза. От 20 до 60 мг/мл (для жидкой сорбированной вакцины).

Определение проводят колориметрическим методом в соответствии с ОФС «Определение сахаров спектрофотометрическим методом».

Формальдегид. Не более 20 мкг/мл (для жидкой сорбированной вакцины). Определение проводят колориметрическим методом в соответствии с ОФС «Количественное определение формальдегида в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Стерильность. Должна быть стерильной. Препарат (лиофилизированную вакцину) предварительно растворяют водой для инъекций. Определение проводят методом прямого посева или мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность».

Бактериальные эндотоксины. Не более 50 ЕЭ/мл. Определение проводят методом гель-тромб теста в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

Аномальная токсичность. Должна быть нетоксична. Препарат (лиофилизированную вакцину) предварительно растворяют водой для инъекций. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Тест-доза для морских свинок – по 1 дозе вакцины подкожно (если нет других указаний в нормативной документации предприятия), для белых мышей – по 1 дозе вакцины внутрибрюшинно, период наблюдения за животными составляет 7 сут.

pH. От 7,4 до 7,8. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Специфическая активность (иммуногенность). Должна быть специфически активна. Минимальная иммунизирующая доза вакцины ($МИД_{50}$) должна быть в пределах от 0,001 до 0,017 мл. Определение проводят биологическим методом.

Для проведения контроля используют необходимое количество образцов вакцины в зависимости от объема 1 прививочной дозы для дальнейшего приготовления 4 последовательных разведений. В качестве препарата сравнения применяется стандартный образец (СО) вакцины клещевого энцефалита, аттестованный в установленном порядке. Содержимое ампул вакцины

или СО объединяют в одной емкости; средой, указанной в нормативной документации, готовят 4 последовательные разведения: для дозы 0,5 мл – 1:10; 1:32; 1:100; 1:320, а для дозы 0,25 мл – 1:5; 1:16; 1:50; 1:160. Для лиофилизированной вакцины клещевого энцефалита содержимое ампул предварительно растворяют в воде для инъекций. Емкости с приготовленными разведениями испытуемой вакцины и стандартного образца вакцины сохраняют на льду на время постановки опыта.

Для иммунизации используют мышей линии Balb/c массой 14 – 16 г, возрастной категории 40 – 42 сут, без различия пола. На каждое разведение испытуемой вакцины или СО используют по 10 мышей. Иммунизацию проводят трёхкратно с интервалом между инъекциями 1 – 3 сут. Животным вводят подкожно соответствующие разведения препаратов в объеме 0,5 мл (для вакцины в детской дозировке – 0,25 мл). Для каждой иммунизации готовят свежие разведения испытуемой вакцины и СО вакцины.

Одновременно в 1 день иммунизации комплектуют контрольную группу мышей той же партии для определения рабочей летальной дозы тест-штамма (LD_{50}). В качестве тест-штамма используют вирулентный штамм «Абсеттаров» ВКЭ.

Через 7 – 9 сут после третьей иммунизации мышам внутрибрюшинно вводят 0,25 мл рабочего разведения ВКЭ тест-штамма «Абсеттаров», приготовленного с использованием среды, указанной в нормативной документации, и содержащего рабочую летальную дозу 100 – 1000 LD_{50}. Параллельно для подтверждения рабочей дозы ВКЭ (LD_{50}), взятой в испытания, используют рабочее разведение вируса и его десятикратные разведения. Рабочее разведение вируса; 1:10; 1:100; 1:1000; 1:10000. Разведения готовят на среде, указанной в нормативной документации. Указанные выше разведения ВКЭ вводят мышам контрольной группы внутрибрюшинно по 0,25 мл, используя по 6 мышей на каждое разведение вируса.

За животными ведут ежедневное наблюдение и регистрируют заболевших и павших мышей. Мышей, павших в течение первых 3 сут после заражения вирусом, исключают из опыта. Учёт результатов проводят на 14 сут после введения вируса.

На основании полученных результатов рассчитывают рабочую летальную дозу (LD_{50}) вирулентного вируса тест-штамма «Абсеттаров», введенного иммунизированным испытуемой вакциной или СО мышам, а также $МИД_{50}$ (минимальную иммунизирующую дозу).

1. Определение рабочей летальной дозы LD_{50} (PLD_{50}) вируса тест-штамма «Абсеттаров». Рабочая LD_{50} вируса, введенная иммунизированным мышам, должна содержать от 100 до 1000 LD_{50}/ 0,25 мл. Расчёт проводят по методу Рида и Менча (табл. 1).

Таблица 1 – **Определение рабочей LD_{50} тест-штамма «Абсеттаров»**

Разведение вируса	Количество мышей					Гибель, %
	всего	абсолютные данные		кумулятивные данные		
		погибло	выжило	погибло	выжило	
10^0 – «рабочее»	6	6	0	18	0	100
10^{-1}	6	6	0	12	0	100
10^{-2} (В)	6	4	2	6	2	75(в)
10^{-3}	6	2	4	2	6	25(а)
10^{-4}	6	0	6	0	12	0

Пример расчёта: Определение рабочей LD_{50} тест-штамма «Абсеттаров».

$$\lg \mathrm{PLD}_{50} = \lg B + \frac{в-50}{в-а} x(1) = 2{,}0 + \frac{75-50}{75-25} x(1) = 2{,}50;$$

$$\mathrm{PLD}_{50} = a \lg \mathrm{PLD}_{50} = a \lg (2{,}50) = 316{,}2;$$

где B – наибольшее разведение вируса, при котором наблюдается гибель более 50 % животных;

$в$ – процент летальности мышей при разведении вируса (В);

а – процент летальности мышей при наименьшем разведении вируса, вызвавшем гибель менее 50 % животных.

Следовательно, реальная доза вируса, введенная мышам при испытании иммуногенности, содержала 316,2 LD_{50} вирулентного тест-штамма «Абсеттаров» в 0,25 мл.

2. *Определение МИД$_{50}$.* $МИД_{50}$ – минимальная иммунизирующая доза вакцины КЭ, которая выражается как отношение объема разовой дозы вакцины, введенной в опыте животным (в мл), к показателю $ПР_{50}$ (протективное разведение вакцины).

$ПР_{50}$ – это наименьшее разведение вакцины и/или СО, которое защищает 50 % иммунизированных мышей от гибели при заражении ВКЭ тест-штамма «Абсеттаров» в дозе от 100 – 1000 LD_{50}.

Для определения $МИД_{50}$ испытуемой серии или СО вакцины предварительно по методу Рида и Менча вычисляют протективное разведение вакцины и СО (табл. 2).

Таблица 2 – **Определение $ПР_{50}$ вакцины и/или СО**

Разведение вакцины	Количество мышей					% выживших мышей
	всего	абсолютные данные		кумулятивные данные		
		погибло	выжило	погибло	выжило	
1:10	10	0	10	0	18	61,54 (а) 18,75 (в)
1:32 (А)	10	5	5	5	8	
1:100	10	8	2	13	3	
1:320	10	9	1	22	1	

$$\lg ПР_{50} = \lg A + \frac{a - 50}{a - в} X(0{,}5) = 1{,}5 + \frac{61{,}54 - 50}{61{,}54 - 18{,}75} X(0{,}5) = 1{,}64;$$

$$ПР_{50} = a \lg ПР_{50}\ (1{,}64) = 43{,}65$$

где: *А* – наибольшее разведение вакцины, защищающее при иммунизации более 50 % мышей от гибели;

а – процент выживаемости мышей при иммунизации дозой вакцины (А);

в – процент выживаемости мышей при наименьшем разведении вакцины, защищающем от гибели менее 50 % мышей;

0,5 – логарифм кратности разведения вакцины в опыте.

Минимальная иммунизирующая доза ($МИД_{50}$) рассчитывается отношением:

$МИД_{50}$ = объем разовой дозы вакцины (мл), введенной мышам/ $ПР_{50}$.

=Серия вакцины клещевого энцефалита считается специфически активной (иммуногенной), если минимальная иммунизирующая доза вакцины ($МИД_{50}$) находится в пределах от 0,001 до 0,017 мл; $МИД_{50}$ СО соответствует аттестованным характеристикам.

Для сопоставления результатов контроля испытуемой серии вакцины и СО возможно вычисление коэффициента сравнительной иммуногенности (*К*), при этом его значение должно быть больше или равно 0,5:

$$K = (0{,}0125 \cdot CT_2)/(L \cdot CT_1),$$

где: CT_1 – $МИД_{50}$ СО, указанный в свидетельстве на СО;

CT_2 – $МИД_{50}$ СО в данном опыте. CT_2 может иметь значения в интервале от 0,5 CT_1 до 2 CT_1;

L – $МИД_{50}$ исследуемой серии вакцины;

0,0125 – числовой коэффициент, соответствующий содержанию в объеме вакцины клещевого энцефалита, вводимом мышам однократно.

(0,5 мл), 40 $МИД_{50}$ (0,5/40 = 0,0125); (0,25 мл), 20 $МИД_{50}$ (0,25/20 = 0,0125).

При известном значении CT_1 = 0,007 рассчитывают значение коэффициента сравнительной иммуногенности:

$$K = \frac{0{,}0125 \cdot 0{,}009}{0{,}012 \cdot 0{,}007} = 1{,}3.$$

При неудовлетворительных результатах определение специфической активности (иммуногенности) повторяют, используя такое же количество образцов.

Необходимо соблюдать санитарные правила «Безопасность работы с микроорганизмами 1 – 2 групп патогенности (опасности)», т.к. выполнение контроля специфической активности вакцины связано с потенциальной опасностью заражения ВКЭ.

Полнота сорбции антигена. Полнота сорбции антигена ВКЭ должна составлять от 80 до 100 %. Метод предназначен для жидкой сорбированной вакцины.

Определение проводят методом ИФА по отношению иммуноферментной активности вакцинного антигена в образцах готовой формы вакцины и в надосадочной жидкости после центрифугирования образцов вакцины. Определение проводят по методике, изложенной в фармакопейной статье или нормативной документации.

Расчёт полноты сорбции антигена. Для расчёта полноты сорбции (ПС) вакцинного антигена на сорбенте – алюминия гидроксиде – вычисляют относительную активность антигена ВКЭ в надосадочной жидкости, сравнивая показатели A – оптические плотности разведений испытуемых образцов сорбированной вакцины и надосадочной жидкости методом параллельных линий (программа «PARALINE» или аналогичная).

Полноту сорбции (ПС) антигена ВКЭ определяют как разницу между 100 % (активность антигена в испытуемом образце вакцины) и полученным значением активности антигена в надосадочной жидкости (в %) по формуле:

$$ПС = 100\ \% - (A \cdot 100)\ \%,$$

где: A – значение относительной активности ВКЭ в надосадочной жидкости испытуемой вакцины, рассчитанное с помощью компьютерной программы «PARALINE» или другой аналогичной.

Если по результатам ИФА во всех пробах надосадочной жидкости испытуемой вакцины антиген ВКЭ не выявляется (оптическая плотность испытуемых образцов ниже оптической плотности критической), то полнота сорбции вакцинного антигена в готовой вакцине равна 100 %, без проведения вычислений.

Растворитель, выпускаемый в комплекте с препаратом (для лиофилизированной вакцины). В состав растворителя входят гель алюминия гидроксида от 0,60 до 1 мг/мл и вода для инъекций до 1 мл.

Описание. Гомогенная непрозрачная суспензия белого цвета, при отстаивании разделяющаяся на бесцветную прозрачную жидкость и рыхлый осадок белого цвета. При встряхивании хлопья, конгломераты и посторонние частицы должны отсутствовать. Определение проводят визуально.

Содержание алюминия. От 0,60 до 1 мг/мл. Определение проводят комплексонометрическим методом титрования в соответствии с ОФС «Определение ионов алюминия в сорбированных иммунобиологических препаратах».

pH. От 5,5 до 8,5. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Время седиментационной устойчивости. Суспензия, образующаяся при встряхивании, не должна расслаиваться в течение 3 мин. Определение проводят визуально.

Стерильность. Должен быть стерильным. Не должен содержать бактерии и грибы. Определение проводят методом прямого посева или мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность».

Аномальная токсичность. Должен быть нетоксичен. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Тест-доза: морским свинкам – 0,5 мл подкожно (если нет других указаний в нормативной документации предприятия), белым мышам – 0,5 мл внутрибрюшинно; период наблюдения за животными составляет 7 сут.

Извлекаемый объём. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Упаковка и маркировка. Определение проводят в соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты». Дополнительно

наносят предупредительные надписи: «Стерильно», «Перед употреблением встряхивать», «Замораживание не допускается», «Хранить в не доступном для детей месте», «Препарат не содержит консервантов и антибиотиков», «Препарат не содержит антитела к ВИЧ-1, 2, к гепатиту С и HbsAg».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Вакцина коревая культуральная живая, лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения

ФС.3.3.1.0032.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину коревую культуральную живую, лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения, представляющую собой препарат, содержащий аттенуированный вакцинный штамм вируса кори Ленинград-16 (Л-16), выращенный на первичной культуре фибробластов эмбрионов перепелов (ФЭП).

Вакцина предназначена для плановой и экстренной профилактики кори.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство вакцины должно осуществляться с соблюдением установленных требований к правилам надлежащей организации производства и контроля качества лекарственных препаратов на всех этапах производства, в основе которого заложена система посевных вирусов.

В качестве субстрата для накопления вируса используют первичную культуру ФЭП.

Производство вакцины должно обеспечивать стабильность показателей качества готового продукта.

Качество исходного сырья и материалов, используемых в производстве, должно быть подтверждено соответствующими документами.

Одна прививочная доза препарата (0,5 мл) содержит:

– активный компонент: вирус кори – не менее 1000 (3,0 lg) тканевых цитопатогенных доз ($ТЦД_{50}$);

– вспомогательные вещества: стабилизатор, состав и количество которого указывают в нормативной документации; антибиотик – гентамицина сульфат – не более 10 мкг, если нет других указаний в нормативной документации.

Производственный штамм

Производственный штамм – вируссодержащая жидкость, приготовленная путем пассирования вакцинного штамма вируса кори в производственном клеточном субстрате. Производственный штамм должен быть идентифицирован с помощью документов, которые должны включать сведения о происхождении штамма, методе аттенуации и уровне пассажа, на котором аттенуация была подтверждена результатами клинических испытаний. С помощью соответствующих лабораторных методов и клинических испытаний на восприимчивых к кори людях должно быть доказано, что штамм вируса кори, используемый в производстве вакцины, безопасен и иммуногенен.

Производственный штамм вируса кори, приготовленный из вакцинного штамма Л-16, депонирован в официальной Государственной коллекции вирусов.

Производственный штамм должен отвечать следующим требованиям:

– быть специфичным;

– обладать генетической стабильностью;

– иметь специфическую активность не ниже 3,0 $lgТЦД_{50}$/0,5 мл;

– быть стерильным: не содержать бактерий, грибов, микоплазм, микобактерий туберкулеза и посторонних вирусов;

– должен обладать репродуктивной активностью: вызывать специфическую дегенерацию в чувствительных культурах клеток, сопровождающуюся накоплением вируса в питательной среде;

– не обладать аномальной токсичностью;

– не обладать остаточной нейровирулентностью при интрацеребральном введении обезьянам;

– не быть контагиозным;

– потеря в массе при высушивании должна быть не более 2,0 %;

– должен сохраняться в лиофилизированном виде при температуре минус (60±10) °С.

По указанным показателям должна быть проверена каждая новая серия производственного штамма.

Примечание

Испытание производственного штамма, посевного вируса, клеточной культуры, сыворотки крупного рогатого скота на присутствие микоплазм должно проводиться двумя методами: цитохимическим и микробиологическим. Испытание на присутствие микоплазм в вирусных сборах, нерасфасованной вакцине и готовом продукте следует проводить микробиологическим методом.

Посевной вирус

Посевной вирус – вируссодержащая жидкость, полученная путем однократного пассирования промежуточного пассажа производственного штамма на производственном субстрате, служит в качестве посевного материала для производства вакцины. Посевной вирус должен обладать теми же характеристиками, что и штамм, из которого он получен. Каждая серия посевного вируса должна быть идентифицирована как вирус кори с помощью соответствующих методов.

Каждая серия посевного вируса должна быть проверена на остаточную нейровирулентность, что определяют в тесте на обезьянах по ОФС «Оценка специфической безопасности производственных штаммов и посевных вирусов кори, паротита и краснухи».

Требования к специфической безопасности вакцины касаются не только отсутствия остаточной нейровирулентности, но также и наличия генетиче-

ской стабильности производственного штамма и посевных серий. Следует оценивать генетическую стабильность новых посевных серий вируса кори так же, как и новых серий производственного штамма. Сравнительный анализ секвенированных последовательностей генома вируса в указанных производственных материалах должен подтвердить их идентичность структуре вакцинного штамма.

Методы культивирования должны обеспечивать сохранение иммуногенных свойств готового препарата, его безопасность и предотвращать контаминацию посторонними вирусами, бактериями, грибами и микоплазмами.

Пассажный уровень вируса в готовом препарате должен быть ограничен. Допускается пассирование производственного штамма и посевных вирусов в культуре ФЭП с таким расчетом, чтобы готовая вакцина содержала вирус, прошедший не более 10 пассажей от вакцинного штамма.

Особое внимание уделяют обеспечению стабильности таких параметров, как множественность заражения и условия культивирования (продолжительность и температура инкубации).

Рекомендуется хранить большой объем серии посевного вируса в качестве основного материала, который изготовитель должен использовать для производства коммерческих серий вакцины. Серии посевного вируса в лиофилизированном виде следует хранить при температуре ниже минус 20 °С, а в нелиофилизированном виде – при температуре ниже минус 60 °С.

Клеточный субстрат, используемый для производства

Субстратом для размножения и накопления вируса кори является первичная культура ФЭП. Оплодотворенное перепелиное яйцо должно быть получено от птиц, которые содержатся в изолированных специализированных хозяйствах, свободных от вирусов лейкоза птиц и других микроорганизмов, патогенных для птиц. Птиц в этих хозяйствах систематически контролируют на отсутствие аденовируса птиц 1-ой, 3-ей и 4-ой групп, энцефаломиелита птиц, гриппа птиц типа А, парамиксовируса, реовируса, пневмовируса, вируса оспы и туберкулеза птиц, вируса анемии цыплят, инфекционного бронхи-

та, бурсита и ларинготрахеита, лейкоза и микоплазмоза птиц, вирусов лимфоидного лейкоза, болезни Марека, болезни Ньюкастла, гемофильной инфекции, сальмонеллеза, пастереллеза, орнитоза и др. инфекционных заболеваний птиц.

При культивировании клеток не допускается использование нативной сыворотки крови человека.

Питательная среда для клеток может содержать pH-индикатор, например, феноловый красный, а также разрешенные антибиотики в минимальной эффективной концентрации. Не допускается использование пенициллина и стрептомицина.

Материалы от животных, которые используют при производстве вакцины, получают из хозяйств, благополучных в отношении бактериальных, вирусных, прионовых и других заболеваний, опасных для человека. Сыворотка крови крупного рогатого скота должна быть получена от животных из стада, в котором отсутствуют такие заболевания, как спонгиформная энцефалопатия и лейкоз крупного рогатого скота. Трипсин, используемый для приготовления клеточной культуры, не должен содержать микоплазм, цирко- и парвовирусов свиней, также должен быть испытан на отсутствие контаминации бактериями и грибами.

Вещества, вносимые в препарат

К веществам, вносимым в препарат, относят сыворотку крови крупного рогатого скота, которая используется для выращивания клеточной культуры. Сыворотка должна быть испытана на отсутствие контаминации вирусами, бактериями, грибами, микоплазмами.

Сыворотка крови животных должна быть удалена после инокуляции культуры клеток посевным вирусом. Перед сбором вируса культуру клеток отмывают, и ростовую среду заменяют бессывороточной поддерживающей средой. Наличие остаточного количества бычьего сывороточного альбумина (БСА) не должно превышать 50 нг в одной прививочной дозе (0,5 мл). Определение проводят иммунохимическим методом на образце готовой серии.

Испытания на этапах производства

В процессе производства проводят исследование на присутствие контаминантов в культуральной жидкости, собранной с культур контрольных клеток, в образцах индивидуальных вирусных сборов и в образцах объединенных вирусных сборов. Индивидуальные вирусные сборы проверяют на стерильность и специфическую активность. Объединенные вирусные сборы проверяют на стерильность, присутствие микоплазм, микобактерий, посторонних вирусов, содержание белка, интактных клеток, специфическую активность. В готовой жидкой нерасфасованной вакцине проверяют специфическую активность, стерильность, присутствие микоплазм.

При производстве вакцины особое значение имеет постоянное выполнение на всех этапах производства внутрипроизводственного анализа основных показателей качества и анализа качества готового продукта при выпуске. Одна прививочная доза препарата содержит

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Лиофилизат – однородная пористая масса. Цвет лиофилизата указывают в нормативной документации. Определение проводят визуально.

Восстановленный препарат – прозрачная жидкость. Цветность восстановленного препарата указывают в нормативной документации. Определение проводят визуально.

Подлинность. Препарат должен содержать вирус кори. Определение проводят в реакции нейтрализации на культуре клеток *Vero*. Подлинность вируса кори в вакцине устанавливают на основании нейтрализации цитопатогенного действия (ЦПД) вируса кори специфической иммунной сыворотkой, содержащей антитела к вирусу кори. В реакции используют аттестованный стандартный образец коревых антител.

Время растворения. Препарат должен растворяться в течение 3 мин при внесении в ампулу растворителя для вакцины из расчета 0,5 мл на одну дозу. Определение проводят визуально.

Механические включения. Восстановленный препарат должен соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и в глазных лекарственных формах».

pH (восстановленного препарата**).** От 7,2 до 7,8. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Потеря в массе при высушивании. Не более 2,0 %. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС **«**Потеря в массе при высушивании».

Бычий сывороточный альбумин. Не более 50 нг в одной прививочной дозе. Определение проводят подходящим валидированным количественным иммунохимическим методом, указанным в нормативной документации.

Стерильность. Препарат не должен содержать бактерий и грибов. Определение проводят методом прямого посева или мембранной фильтрации с использованием тиогликолевой среды при двух температурных режимах в соответствии с ОФС «Стерильность».

Присутствие микоплазм. Препарат не должен содержать микоплазм. Определение проводят микробиологическим методом в соответствии с ОФС «Испытание на присутствие микоплазм». Если при испытаниях сырья и материалов при входном контроле и на всех контрольных точках в технологическом процессе контаминация микоплазмами надлежащими методами не обнаружена, то испытание готовой серии препарата на присутствие микоплазм может не проводиться.

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичным. Определение проводят биологическим методом на белых мышах и на морских свинках обоего пола в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

Животным вводят по одной прививочной дозе препарата в объеме 0,5 мл внутрибрюшинно, если нет других указаний в нормативной документации.

Специфическая активность. Прививочная доза (0,5 мл) должна содержать не менее 1000 (3,0 lg) $ТЦД_{50}$ вируса кори. Титр вируса определяют в каждой из 5 ампул серии готового препарата по ЦПД вируса на культуре клеток Vero. Каждый образец вакцины должен иметь специфическую активность не ниже регламентированной, в противном случае проводят повторный контроль специфической активности дополнительных 5 образцов, результат которого считают окончательным. Минимально регламентированное содержание вируса в прививочной дозе должно сохраняться в течение всего срока годности.

Одновременно с определением титра вируса в образцах серии проводят титрование стандартного образца (СО) активности вируса кори. Одну ампулу стандартного образца титруют три раза для подтверждения достоверности каждого количественного определения активности.

Учет результатов проводят по ЦПД с помощью инвертированного микроскопа (увеличение: объектив 10× – окуляр 10×) в сроки, указанные в нормативной документации.

Наибольшее разведение вакцины, вызывающее ЦПД в 50 % лунок с зараженной клеточной культурой, принимают за титр вируса. Титр вируса в вакцине рассчитывают по методу Рида и Менча или Спирмена-Кербера.

При титровании вакцины в лунки планшетов вносят по 0,1 мл каждого разведения вакцины, т.е. объем в 5 раз меньший, чем объем прививочной дозы. Для расчета активности вируса в прививочной дозе к титру вируса, рассчитанному в $lgТЦД_{50}$/0,1мл, добавляют постоянную величину, равную lg 5, т.е. 0,7.

Критерии приемлемости результатов:

– диапазон доверительного интервала (P=0,95) среднего значения титра СО, определенного при трехкратном титровании 1 ампулы, должен быть в пределах ± 0,3 lg $ТЦД_{50}$;

– титр вируса в СО не должен отличаться более, чем на 0,5 lg $ТЦД_{50}$ от аттестационного значения.

Производственный штамм. Каждая новая серия аттенуированного вакцинного штамма вируса кори Ленинград-16 (Л-16), выращенного на первичной культуре фибробластов эмбрионов перепелов (ФЭП) должна быть проверена в процессе хранения на генетическую стабильность (не реже 1 раза в 5 лет).

Термостабильность. Препарат должен быть термостабильным. Испытание проводят, определяя специфическую активность при одновременном титровании 5 образцов вакцины, инкубированных при температуре (37±1) °С в течение 7 сут, и 5 образцов вакцины, хранившихся при температуре от 2 до 8 °С. Препарат считают прошедшим испытание, если средняя геометрическая величина титра вируса в образцах после прогревании снижается не более, чем на 1 lg.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Дополнительная информация: субстрат культивирования вируса и предупредительные надписи: «Хранить при температуре от 2 до 8 °С в недоступном для детей месте», «Избегать контакта вакцины с дезинфицирующими средствами».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С.

.

Вакцина оспенная живая ФС.3.3.1.0033.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину оспенную живую. Вакцина представляет собой лиофилизат, содержащий вирус осповакцины, выращенный на скарифицированной коже телят, частично освобожденный от бактериальной флоры обработкой хлоргексидина биглюконатом. Одна прививочная доза должна содержать не менее 10^6 ООЕ (спорообразующих единиц). Вакцина выпускается с растворителем – 50 % раствором глицерина, стабилизатор – пептон в конечной концентрации 5 – 10 %. Вакцина не содержит антибиотиков.

Вакцина предназначена для профилактики натуральной оспы по эпидемическим показаниям, вакцинации лиц, работающих с вирусами осповакцины и оспы животных, патогенными для человека.

ПРОИЗВОДСТВО

Все этапы производства вакцины должны быть валидированы в соответствии с установленными требованиями к правилам организации производства и контроля качества лекарственного препарата, гарантирующих его качество и безопасность для человека.

Производство оспенной вакцины должно проводиться в отдельных изолированных помещениях, в которых не допускается производство других лекарственных средств. Условия производства должны соответствовать требованиям санитарных правил «Безопасность работы с микроорганизмами III

– IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Этапы производства оспенной вакцины включают: получение оспенного соскоба с кожи телят; очистку оспенного соскоба от белка кожи телят центрифугированием; освобождение от микрофлоры путем обработки хлоргексидина биглюконатом; приготовление жидкой вакцины и внесение стабилизатора; розлив и герметизация ампул в атмосфере азота. В процессе производства обязательным является испытание качества исходных материалов, вакцинного штамма, ляпиновакцины I, II и III генераций посевного вируса. Также обязательным является определение содержания патогенных анаэробных микроорганизмов в 1 мл вакцины, которое необходимо проводить на производстве на этапе контроля готовой нерасфасованной продукции, до ее маркировки. Культивирование патогенных анаэробных микроорганизмов проводят в анаэробных условиях. Испытание должно проводиться с использованием питательных сред, пригодных для культивирования патогенных анаэробных микроорганизмов.

Определение проводят методом посева образцов вакцины на среду Тароцци с созданием анаэробных условий. Для испытания используют не менее 5 образцов препарата. Содержимое каждой ампулы с вакциной растворяют в 0,2 мл стерильного 0,004 М буферного фосфатно-цитратного раствора (ФЦБ) Мак-Илвейна.

Примечания

Приготовление ФЦБ раствора Мак-Илвейна 0,004 М (pH 7,2 – 7,4). Готовят растворы 1 и 2.

Раствор 1: Растворяют 2.1 г лимонной кислоты в 100 мл воды очищенной.

Раствор 2: В мерной колбе вместимостью 1000 мл растворяю в 500 мл воды очищенной 28,4 г динатрия гидрофосфата безводного или 35,6 г динатрия гидрофосфата дигидрата, или 71,6 г динатрия гидрофосфата додекагидрата, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Смешивают 2 мл раствора 1 и 18 мл раствора 2 в мерной колбе вместимостью 1000 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки и пере-

мешивают. Полученный раствор должен иметь pH 7,2 – 7,4. Если pH раствора более 7,4, его доводят до нормы раствором 1. В случае, если pH полученного раствора меньше 7,2, приготовление раствора повторяют. Буферный раствор стерилизуют при температуре (120 ± 1) °С и давлении (0,1 ± 0,01) МПа в течение 8 – 30 мин (в зависимости от объема) или фильтруют через мембраны с диаметром пор 0,22 мкм и хранят при температуре от 2 до 8 °С. Срок хранения от 10 до 30 сут в зависимости от способа укупорки флаконов (способ укупорки флаконов должен быть указан в нормативной документации).

Среда Тароцци:

- Гидролизат мяса (по Хоттингеру)[a)] – 250 мл;
- Ликадекс ПФ декстрозы моногидрат – 5 г;
- Натрия хлорид – 5 г;
- Агар микробиологический – 1 г;
- Фарш говяжий – 200 г;
- Вода очищенная – 1000 мл.

pH готовой среды (7,3 ± 0,2).

Готовую среду разливают в пробирки по 10 мл и стерилизуют при давлении (0,1 ± 0,01) МПа, температуре (120 ± 1) °С в течение 15 мин. Хранят при температуре от 2 до 8 °С не более 1 мес.

а) Гидролизат мяса (по Хоттингеру):

- Панкреатин 45 ед. – 20 г;
- Фарш говяжий – 500 г;
- Вода очищенная – 1000 мл.

Стерилизуют при давлении (0,1 ± 0,01) МПа, температуре (120 ± 1) °С в течение 15 мин. Хранят при температуре от 2 до 8 °С не более 1 мес.

б) Фарш говяжий (на 1 кг).

Вырезка говяжья – 1,05 кг.

Хранению не подлежит.

Используемая питательная среда для культивирования патогенных анаэробных микроорганизмов должна обеспечивать рост соответствующих тест-штаммов. Обязательным условием при производстве препарата является определение посторонних примесей – хлоргексидина биглюконата, который используют в виде 0,5 % раствора для обработки шкур телят с оспенным детритом. Содержание примеси хлоргексидина биглюконата определяют в полуфабрикате на стадии получения оспенного соскоба. Содержание хлоргек-

сидина биглюконата в полуфабрикате не должно превышать 0,05 % при определении спектрофотометрическим методом.

Требования к животным. В качестве продуцентов для производства оспенной вакцины и посевного материала используют телят крупного рогатого скота в возрасте от 6 до 18 мес любой породы, предпочтительно светлой масти. Животные должны поступать из хозяйств, благополучных в отношении инфекционных агентов, в том числе прионовой природы. Каждая партия животных должна сопровождаться ветеринарным свидетельством, подтверждающим отсутствие инфекционных заболеваний. Все поступившие телята должны пройти 30-дневный карантин.

Требования к производственному штамму. В качестве вакцинного штамма используют вирус осповакцины, штамм Л-ИВП, полученный путем накожных пассажей на кроликах и телятах вакцины, изготовленной из штамма *Lister* института Листера (Великобритания). Штамм Л-ИВП хранится в коллекции производственных штаммов на предприятии-изготовителе. Для поддержания стабильных свойств штамма проводят 1 пассаж исходного штамма на коже кролика. Материалом исходного штамма служит ляпиновакцина III генерации. В результате пассирования исходного штамма на кроликах получают ляпину. Посевной вирус I генерации получают в результате пассажа ляпины на коже теленка. Посевной вирус II генерации получают путем пассажа посевного вируса I генерации на коже теленка. Для приготовления вакцины используют только ляпиновакцину III генерации. Взвесь посевного вируса должна отвечать следующим требованиям:

- может содержать суммарно не более 50 посторонних микроорганизмов в 1 мл, в том числе аэробных и факультативно-анаэробных бактерий и грибов;

- не должна содержать бактерий семейства *Enterobacteriaceae* и вида *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*, а также патогенных анаэробных бактерий;

- быть генетически однородной: допускается образование на хорионаллантоисных оболочках куриных эмбрионов (ХАО КЭ) не более 10 поражений поверхностного диффузного типа на 1000 типичных оспин (от 0,5 до 3 мм);

- на скарифицированной коже кроликов образовывать типичные вакцинальные поражения (оспины);

- не вызывать некрозы при внутрикожном введении кроликам 10^4 ООЕ/0,1 мл (ООЕ – оспообразующие единицы);

- не вызывать гибель кроликов при введении в мозг 10^4 ООЕ/0,1 мл;

- быть безвредной для морских свинок при введении подкожно 1 мл посевного вируса и для белых мышей при введении 0,2 мл посевного вируса подкожно;

- иметь специфическую активность не менее $1 \cdot 10^9$ ООЕ/мл.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Пористая масса от бело-серого до светло-желтого цвета, гигроскопичная.

Подлинность. Вакцина должна вызывать на хорионаллантоисных оболочках (ХАО) 12-дневных куриных эмбрионов образование белых плотных поражений диаметром от 0,5 до 3 мм (испытания проводят одновременно с испытанием специфической активности оспенной вакцины). Вызывать типичные вакцинальные поражения (оспины) при накожном введении кроликам. Испытание проводят на 2 белокожих кроликах породы Шиншилла массой от 2,5 до 3,5 кг. На предварительно депиллированные и скарифицированные участки кожи кроликов площадью около 5 $см^2$ наносят по 0,1 мл вакцины в разведениях 10^{-3}, 10^{-4} и 10^{-5}. Для разведения используют 0,9 % раствор натрия хлорида. Испытания осуществляют параллельно со стандартным образцом активности специфичности и некротической активности оспенной вакцины.

Через 5 – 7 сут у животных обеих групп на зараженных участках кожи должны образовываться типичные вакцинальные поражения (оспины).

При неудовлетворительных результатах контроль повторяют, как при первичном испытании. При получении неудовлетворительных результатов при повторном испытании серию препарата бракуют.

Время растворения. Должна растворяться в 0,3 мл 50 % раствора глицерина в течение 1 мин при перемешивании стеклянной палочкой. После растворения вакцина должна представлять собой опалесцирующую жидкость от беловато-серого до светло-желтого цвета без осадка и посторонних включений. Определение проводят визуально.

pH (восстановленного препарата). От 6,5 до 7,5. Испытания проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Потеря в массе при высушивании. Не более 3,0 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании». При получении неудовлетворительных результатов контроль повторяют на удвоенном количестве образцов. При получении неудовлетворительных результатов при повторном испытании серию препарата бракуют.

Микробиологическая чистота. 1 мл растворенной вакцины должен содержать суммарно не более 50 микроорганизмов, в том числе аэробных и факультативно-анаэробных бактерий и грибов; бактерии семейства *Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus* должны отсутствовать. Содержимое ампул с вакциной растворяют до первоначального объема в 0,004 М стерильном ФЦБ растворе Мак-Илвейна. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

Аномальная токсичность. Должна быть нетоксичной. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Испытание проводят на 5 здоровых белых мышах массой 10 – 12 г и 2 морских свинках массой 250 – 300 г.

Вакцину растворяют до первоначального объема, указанного на ампуле, стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида и вводят подкожно морским

свинкам в объеме 1 мл, белым мышам в объёме 0,2 мл. Наблюдение за животными проводят в течение 7 сут. Все животные должны оставаться живыми, признаки интоксикации и уменьшение массы тела должны отсутствовать. В случае гибели или появления признаков интоксикации или снижения массы тела у 1 животного испытание повторяют.

Вакцина выдерживает испытание, если ни 1 животное из второй группы не погибнет, не появятся признаки интоксикации и не будет отмечено уменьшение массы тела.

Специфическая активность. Вакцина должна иметь активность не менее $1 \cdot 10^8$ ООЕ/мл и не более $2 \cdot 10^9$ ООЕ/мл. Испытания проводят биологическим методом на хорионаллантоисных оболочках 12-дневных куриных эмбрионов (КЭ) от кур породы «Леггорн», «Роменбраун», «Родонит-2», «Изобраун» или «Хайсек», или пород кур, эмбрионы которых чувствительны к вирусу осповакцины.

Примечание

Куриные эмбрионы получают из хозяйств, свободных от вирусных и других возбудителей, патогенных для человека.

Контроль специфической активности вакцины проводят одновременно с определением специфической активности стандартного образца активности, специфичности и некротической активности оспенной вакцины.

Подготовка куриных эмбрионов. Проводят овоскопию куриных эмбрионов в затемненном помещении. Каждый эмбрион просматривают в направленном пучке света. Свет должен падать сверху на тупой конец яйца. Яйцо с погибшим эмбрионом, или имеющее кровоизлияние под оболочкой, бракуют. В центре воздушного мешка на тупом конце яйца и на боковой поверхности яйца на участке между сосудами и их ответвлениями карандашом делают отметку. В местах отметок с соблюдением правил асептики пропиливают бормашиной с абразивным диском отверстия (щели) длиной 3 – 4 мм и шириной 1,5 мм, не повреждая оболочки. Яйцо укладывают так, чтобы отверстие на боковой стороне было обращено вверх. Подскорлупную оболочку в центре

воздушного мешка прорывают плоской полукруглой хирургической иглой. Затем на отверстие, расположенное на боковой поверхности, вносят 0,1 мл 0,004 М стерильного ФЦБ раствора Мак-Илвейна, подогретого до температуры (50 ± 5) °С, и той же иглой осторожно продавливают подскорлупную оболочку. После этого практически вся капля раствора проходит под подскорлупную оболочку и частично отслаивает ХАО.

Из отверстия в центре воздушного мешка резиновой грушей осторожно отсасывают воздух до полного опускания ХАО и создания искусственного воздушного мешка под боковой щелью. Для контроля наличия и величины искусственного воздушного мешка вновь проводят овоскопию и бракуют эмбрионы, имеющие кровоизлияния, воздушные мешки под ХАО или без искусственных воздушных мешков. Яйца с опущенной ХАО помещают на лотки отверстием вверх и выдерживают 2 ч в термостате при температуре (37 ± 1) °С. Затем проводят овоскопию повторно и бракуют эмбрионы с воздушными мешками под ХАО, без искусственных воздушных мешков и эмбрионы с кровоизлияниями.

Приготовление десятикратных разведений. Для приготовления разведений используют стерильный ФЦБ. Готовят 7 десятикратных разведений: в штатив устанавливают 7 пробирок, которые маркируют от 10^{-1} до 10^{-7}. В первую пробирку вносят 4 мл ФЦБ. В последующие 6 пробирок вносят по 4,5 мл ФЦБ. Вскрывают 2 ампулы с вакциной и растворяют их содержимое в 0,5 мл ФЦБ, взятом из первой пробирки с маркировкой 10^{-1}. Полученный раствор из 2 ампул переносят пипеткой в пробирки с маркировкой 10^{-1}. Этой же пипеткой тщательно перемешивают раствор в пробирке и переносят 0,5 мл в пробирку с маркировкой 10^{-2}, не касаясь пипеткой жидкости, после чего меняют пипетку. Аналогичным образом готовят последующие разведения до разведения 10^{-7}, меняя пипетки после каждого разведения.

Постановка основного опыта. Для заражения эмбрионов используют разведения вакцины 10^{-6} и 10^{-7}. Каждое разведение вируса вводят на ХАО 6 куриных эмбрионов по 0,1 мл в отверстие на боковой поверхности яйца. Кру-

говым вращением яйца вирус равномерно распределяют по ХАО. Инокулированные эмбрионы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 42 – 48 ч. Затем эмбрионы вскрывают, разрезая скорлупу по длинной оси яйца, визуально определяют жизнеспособность куриного эмбриона. Изолируют пинцетом ХАО, промывают в воде и подсчитывают число оспин на каждой ХАО. Среднеарифметическое количество типичных оспин, развившихся на ХАО в учетном разведении, должно быть не менее 10. Специфическую активность вируса выражают в оспообразующих единицах в 1 мл (ООЕ/мл) и вычисляют по формуле:

$$\text{ООЕ/мл} = \frac{\text{среднее арифметическое число оспин на ХАО}}{\text{объем инфицирующей дозы} \cdot \text{разведение вируса}}$$

Контроль специфической активности вакцины проводят одновременно с определением специфической активности стандартного образца активности, специфичности и некротической активности оспенной вакцины в соответствии с инструкцией по применению.

Результат испытания серии вакцины принимают к учету при получении удовлетворительного результата определения специфической активности стандартного образца.

При получении неудовлетворительных результатов контроля серии вакцины проводят повторное испытание на удвоенном количестве образцов вакцины: разведение 10^{-1} получают растворением содержимого 4 ампул вакцины в 8 мл ФЦБ.

При получении неудовлетворительных результатов при повторном испытании серию препарата бракуют.

Некротическая активность. Вакцина в дозе 10^4 ООЕ/0,1 мл не должна вызывать некрозы при внутрикожном введении кроликам. Испытание проводят на 2 белокожих кроликах породы Шиншилла массой от 2,5 до 3,5 кг. Шерсть на боках в местах предполагаемых прививок удаляют. Для проведения испытания вакцину разводят стерильным ФЦБ до содержания 10^3; 10^4 и

10^5 ООЕ в 0,1 мл. Каждое разведение вакцины вводят кролику внутрикожно по 0,1 мл в 2 участка. Для проверки чувствительности кроликов к вирусу осповакцины тем же кроликам аналогичным образом на другом боку вводят по 0,1 мл растворы стандартного образца активности, специфичности и некротической активности оспенной вакцины с концентрацией 10^3; 10^4 и 10^5 ООЕ/0,1мл. Наблюдение за животными проводят в течение 4 – 5 сут.

Учет результатов. В местах инъекций вируса в дозе 10^4 ООЕ/0,1 мл не должны образовываться некрозы. Допустимо наличие ограниченных инфильтратов розового цвета. При появлении некрозов в дозе 10^4 ООЕ/0,1 мл хотя бы у 1 кролика и их отсутствие при введении стандартного образца испытание повторяют. При развитии некрозов после повторного испытания хотя бы у 1 кролика вакцину бракуют. При наличии некрозов в опыте со стандартным образцом активности, специфичности и некротической активности оспенной вакцины контроль повторяют.

Производственный штамм. Штамм Л-ИВП, полученный путем накожных пассажей на кроликах и телятах вакцины, изготовленной из штамма *Lister* института Листера (Великобритания) контролируется на предприятии-изготовителе при получении каждой генерации посевного вируса.

Термостабильность. Вакцина должна быть термостабильной. Для проведения контроля вакцину прогревают при температуре (37 ± 1) °С в течение 28 сут. Затем проводят контроль специфической активности прогретых образцов вакцины с одновременным контролем стандартного образца активности, специфичности и некротической активности оспенной вакцины (раздел «Специфическая активность»). Возможно проведение контроля одновременно с контролем специфической активности препарата в одном испытании. Вакцину считают термостабильной, если после прогревания она имеет специфическую активность не менее 10^8 ООЕ/мл.

При получении неудовлетворительных результатов контроля серии вакцины проводят повторное испытание на удвоенном количестве образцов

вакцины: разведение 10^{-1} получают растворением содержимого 4 ампул вакцины в 8 мл ФЦБ.

При получении неудовлетворительных результатов при повторном испытании серию препарата бракуют.

Примечание

При необходимости экстренного контроля допускается прогревание вакцины при температуре (61 ± 1) °С в течение 5 ч.

Растворитель, выпускаемый в комплекте с препаратом

Растворитель – 50 % раствор глицерина, готовят из глицерина на 0,004 М ФЦБ растворе Мак – Илвейна.

Описание. Прозрачная бесцветная сиропообразная жидкость без запаха.

Подлинность. Должен давать характерную реакцию на трехатомный спирт. К 3 мл растворителя прибавляют 10 капель 10 % раствора меди сульфата и 0,2 мл 10 % раствора натрия гидроксида, должно появиться синее окрашивание, не изменяющееся при кипячении.

pH. От 6,8 до 7,4. Испытания проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Количественное определение. Массовую долю глицерина в растворителе определяют по плотности в соответствии с ОФС «Плотность». Показатель плотности растворителя должен быть в пределах от 1,113 до 1,140 г/см^3, что соответствует массовой доле глицерина 45 – 55 %.

Стерильность. Должен быть стерильным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Стерильность», если в нормативной документации нет иных указаний.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С. Допускается однократное кратковременное транспортирование при температуре от 9 до 20 °С (не более 24 ч).

Вакцина оспенная инактивированная ФС.3.3.1.0034.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину оспенную инактивированную. Вакцина представляет собой вирус осповакцины, выращенный на скарифицированной коже телят, обработанной хлоргексидина биглюконатом и инактивированный гамма-излучением Co^{60}. Одна прививочная доза вакцины содержит активный компонент – инактивированный антиген вируса осповакцины – 50 мкг (величина расчетная определяется по содержанию общего белка); стабилизаторы: желатин – 1 % и сахароза – 5 % в конечной концентрации; соли буферной системы – натрия гидрофосфат додекагидрат и лимонная кислота моногидрат. Вакцина не содержит антибиотиков и консервантов.

Вакцина предназначена для вакцинации детей с двухлетнего возраста, подростков и взрослых на первом этапе при двухэтапном методе вакцинации; на втором этапе применяют вакцину оспенную живую.

ПРОИЗВОДСТВО

Все этапы производства вакцины должны осуществляться с соблюдением установленных требований к правилам организации производства и контролю качества лекарственного препарата, гарантирующих его качество и безопасность для человека.

Производство вакцины оспенной инактивированной должно проводиться в отдельных изолированных помещениях, в которых не допускается производство других лекарственных средств. Условия производства должны соответствовать требованиям санитарных правил «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Этапы производства включают получение оспенного соскоба с кожи телят; очистку оспенного соскоба от белка кожи центрифугированием; приготовление жидкой вакцины; инактивацию гамма-излучением Co^{60} и внесение стабилизатора; розлив и герметизацию ампул в атмосфере азота.

В процессе производства обязательным является испытание качества исходных материалов, ляпиновакцины I, II и III генераций посевного вируса. Определение общего белка проводят в полуфабрикате вакцины после разведения буферным раствором до добавления стабилизатора. Определение проводят колориметрическим методом в соответствие с ОФС «Определение белкового азота с реактивом Несслера с предварительным осаждением белкового материала в иммунобиологических лекарственных препаратах». Регламентированная норма 100 – 200 мкг/мл.

Обязательным условием при производстве препарата является определение посторонних примесей (хлоргексидина биглюконата), использующегося в виде 0,5 % раствора для обработки шкур телят с оспенным детритом. Содержание примеси хлоргексидина биглюконата определяют в полуфабрикате на стадии получения оспенного соскоба. Содержание хлоргексидина биглюконата в полуфабрикате не должно превышать 0,05 % при определении спектрофотометрическим методом.

Требования к животным. В качестве продуцентов для производства вакцины оспенной инактивированной и посевного материала используют телят крупного рогатого скота. Животные должны поступать из хозяйств, благополучных в отношении инфекционных агентов, в том числе и прионовой природы. Каждая партия животных должна сопровождаться ветеринарным

свидетельством, подтверждающим отсутствие инфекционных заболеваний. Все поступившие телята должны пройти 30-дневный карантин.

Требования к производственному штамму. В качестве вакцинного штамма используют вирус осповакцины, штамм Л-ИВП, полученный путем накожных пассажей на кроликах и телятах вакцины, приготовленной из штамма *Lister* института Листера (Великобритания). Штамм Л-ИВП хранится в коллекции производственных штаммов на предприятии-изготовителе. Для поддержания стабильных свойств штамма проводят 1 пассаж исходного штамма на коже кролика. Материалом исходного штамма служит ляпиновакцина III генерации. В результате пассирования исходного штамма на кроликах получают ляпину. Посевной вирус I генерации получают в результате пассажа ляпины на коже теленка. Посевной вирус II генерации получают путем пассажа посевного вируса I генерации на коже теленка. Для приготовления вакцины используют только ляпиновакцину III генерации. Взвесь посевного вируса должна отвечать следующим требованиям:

- может содержать суммарно не более 50 посторонних микроорганизмов в 1 мл, в том числе аэробных и факультативно-анаэробных бактерий и грибов;

- не должна содержать бактерий семейства *Enterobacteriaceae* и вида *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*, а также патогенных анаэробных бактерий;

- быть генетически однородной, допускается образование на хорионаллантоисных оболочках (ХАО) куриных эмбрионов не более 10 поражений поверхностного диффузного типа на 1000 типичных оспин (от 0,5 до 3 мм);

- на скарифицированной коже кроликов образовывать типичные вакцинальные поражения (оспины);

- не вызывать некрозы при внутрикожном введении кроликам 10^4 ООЕ/0,1 мл (ООЕ – оспообразующие единицы);

- не вызывать гибель кроликов при введении в мозг 10^4 ООЕ/0,1 мл;

- быть безвредной для морских свинок при введении подкожно 1 мл посевного вируса и для белых мышей при введении 0,2 мл посевного вируса подкожно;

- иметь специфическую активность не менее $1 \cdot 10^9$ ООЕ/мл.

Производственный штамм контролируется при получении каждой генерации посевного вируса.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Пористая масса от белого до серо-белого цвета, гигроскопичная.

Восстановленный препарат - бесцветная или желтоватого цвета опалесцирующую жидкость.

Подлинность. Вакцина должна вызывать образование вируснейтрализующих антител к вирусу осповакцины в сыворотке крови белых крыс, однократно иммунизированных внутривенно 1 дозой вакцины. Определение проводят в соответствии с разделом «Антигенная активность».

При неудовлетворительных результатах контроль повторяют, как при первичном испытании. При повторном испытании при получении неудовлетворительных результатов серию препарата бракуют.

Время растворения. Должна полностью растворяться в 0,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида при встряхивании в течение 3 мин. Метод определения – визуальный.

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH (восстановленного препарата)**.** От 6,8 до 7,6. Испытания проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Потеря в массе при высушивании. Не более 3,0 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Стерильность. Вакцина должна быть стерильной. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Стерильность», если в нормативной документации нет других указаний.

Пирогенность. Должна быть апирогенной. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Тест - доза вводимого препарата должна составлять 0,5 мл на кролика.

Аномальная токсичность. Должна быть нетоксичной. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Тест-доза – по 0,5 мл подкожно 2 морским свинкам массой 250 – 300 г и по 0,5 мл внутрибрюшинно 5 белым мышам массой 17 – 20 г. Вакцину растворяют прилагаемым растворителем.

При получении неудовлетворительных результатов контроль повторяют на удвоенном количестве образцов. При получении неудовлетворительных результатов при повторном испытании серию препарата бракуют.

Специфическая безопасность. Не должна содержать живого вируса осповакцины. Полноту инактивации вируса осповакцины испытывают на ХАО 12-дневных куриных эмбрионов (КЭ).

Примечание

Используют КЭ от кур породы «Леггорн», «Роменбраун», «Родонит-2», «Изобраун» или «Хайсек» или пород кур, эмбрионы которых чувствительны к вирусу осповакцины. КЭ получают из хозяйств, свободных от вирусных и других возбудителей, патогенных для человека.

Подготовка КЭ. Проводят овоскопию КЭ в затемненном помещении. Каждый эмбрион просматривают в направленном пучке света. Свет должен падать сверху на тупой конец яйца. Яйцо с погибшим эмбрионом или с кровоизлиянием под оболочкой бракуют. В центре воздушного мешка на тупом конце яйца и на боковой поверхности яйца, на участке между сосудами и их ответвлениями карандашом делают отметку. В местах отметок с соблюдением правил асептики пропиливают бормашиной с абразивным диском отверстия (щели) длиной 3 – 4 мм и шириной 1,5 мм, не повреждая оболочки. Яйцо укладывают так, чтобы отверстие на боковой стороне было обращено

вверх. Подскорлупную оболочку в центре воздушного мешка прорывают плоской полукруглой хирургической иглой. Затем на отверстие, расположенное на боковой поверхности, вносят 0,1 мл 0,004 М стерильного фосфатно-цитратного буферного (ФЦБ) раствора Мак-Ильвейна, подогретого до температуры (50 ± 5) °С, и той же иглой осторожно продавливают подскорлупную оболочку. После этого практически вся капля раствора проходит под подскорлупную оболочку и частично отслаивает ХАО.

Из отверстия в центре воздушного мешка резиновой грушей осторожно отсасывают воздух до полного опускания ХАО и создания искусственного воздушного мешка под боковой щелью. Для контроля наличия и величины искусственного воздушного мешка вновь проводят овоскопию и бракуют эмбрионы, имеющие кровоизлияния, воздушные мешки под ХАО или без искусственных воздушных мешков. Яйца с опущенной ХАО помещают на лотки отверстием вверх и выдерживают 2 ч в термостате при температуре (37 ± 1) °С. Затем проводят овоскопию повторно и бракуют эмбрионы с воздушными мешками под ХАО, без искусственных воздушных мешков и с кровоизлияниями.

Постановка основного опыта. При испытании специфической безопасности вакцины используют 20 подготовленных КЭ и 10 ампул вакцины. Содержимое ампулы с вакциной растворяют в 0,5 мл ФЦБ. Содержимое каждой ампулы контролируют на 2 эмбрионах. По 0,1 мл растворенной вакцины наносят на ХАО одного эмбриона и равномерно распределяют по оболочке осторожным круговым вращением яйца. Инокулированные эмбрионы укладывают отверстием на боковой поверхности вверх и помещают в термостат на 48 ч при температуре (37 ± 1) °С, затем проводят учет результатов. Параллельно определяют чувствительность КЭ к вирусу осповакцины. Для этого используют не менее 12 подготовленных КЭ и стандартный образец активности, специфичности и некротической активности оспенной вакцины в соответствии с инструкцией по применению. Инкубируют параллельно с основным опытом. Через 48 ч КЭ вскрывают, разрезая скорлупу по длинной оси

яйца. Отслаивают пинцетом участок ХАО, выстилающий полость искусственного мешка, и отмывают его от крови и белка водой или ФЦБ. Каждую оболочку просматривают на черном фоне на наличие поражений. Препарат не должен вызывать специфических поражений на ХАО куриных эмбрионов. В тесте должно быть подтверждено установленное значение показателя «Специфическая активность» стандартного образца активности, специфичности и некротической активности оспенной вакцины. При соблюдении данных условий делают заключение об отсутствии живого вируса в испытуемом образце вакцины.

В случае обнаружения типичных оспин в основном опыте проводят контроль удвоенного количества испытуемых образцов вакцины. При повторном обнаружении типичных оспин на ХАО КЭ испытуемую вакцину бракуют. В случае обнаружения неспецифических поражений, участок ХАО измельчают и готовят суспензию в 2 мл ФЦБ. Взвесь центрифугируют в течение 15 мин при 2000 об/мин. Надосадочную жидкость наносят по 0,1 мл на ХАО куриных эмбрионов. Отсутствие типичных поражений считают доказательством инактивации вируса. При обнаружении на ХАО КЭ специфических оспин вакцину бракуют.

Примечания

1. Приготовление ФЦБ раствора Мак-Ильвейна 0,004 М, pH (7,2 – 7,4). Готовят растворы 1 и 2.

Раствор 1: Растворяют 2,1 г лимонной кислоты в 100 мл воды очищенной.

Раствор 2: В мерной колбе вместимостью 1000 мл растворяют в 500 мл воды очищенной 28,4 г динатрия гидрофосфата безводного или 35,6 г динатрия гидрофосфата дигидрата, или 71, 6 г динатрия гидрофосфата додекагидрата, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Смешивают 2 мл раствора 1 и 18 мл раствора 2 в мерной колбе вместимостью 1000 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Полученный раствор должен иметь pH 7,2 – 7,4. Если pH полученного раствора более 7,4, его доводят до нормы раствором 1. В случае, если pH полученного раствора меньше 7,2, приготовление раствора повторяют. Буферный раствор стерилизуют при температуре (120 ± 1) °С и давлении (0,1 ± 0,01) МПа в течение 8 – 30 мин (в зависимости от объема) или фильтруют

через мембраны с диаметром пор 0,22 мкм и хранят при температуре от 2 до 8 °С. Срок хранения от 10 до 30 сут в зависимости от способа укупорки флаконов (способ укупорки флаконов должен быть указан в нормативной документации).

Антигенная активность. Среднегеометрический титр (СГТ) вирус-нейтрализующих антител (ВНА) к вирусу осповакцины в сыворотках крови белых крыс, иммунизированных внутривенно 1 дозой вакцины, должен быть не менее 1:80. Контроль проводят на 6 белых крысах массой 80 – 100 г линии Wistar или нелинейных белых крысах без различия пола. Крысам вводят внутривенно в хвостовую вену растворенный препарат испытуемой вакцины в объеме 0,5 мл. Через 28 сут производят взятие крови от каждой крысы и получают сыворотки. Для контроля опыта получают нормальную сыворотку крови от неиммунной крысы. Все полученные сыворотки прогревают при температуре (56 ± 1) °С в течение 30 мин и исследуют в реакции нейтрализации. Постановку реакции нейтрализации проводят на ХАО 12-дневных КЭ. Для постановки реакции используют подготовленные КЭ (раздел «Специфическая безопасность») и в качестве вируса стандартный образец активности специфичности и некротической активности оспенной вакцины. Определяют рабочее разведение вируса титрованием на ХАО 12-дневных КЭ. Для этого готовят ряд последовательных десятикратных разведений вируса на ФЦБ (в соответствии с инструкцией по применению стандартного образца активности, специфичности и некротической активности оспенной вакцины). Каждое разведение вируса в объёме 0,1 мл вводят на ХАО 6 КЭ. Инкубируют в термостате 48 ч при температуре (37 ± 1) °С. КЭ вскрывают, подсчитывают количество развившихся на ХАО оспин, рассчитывают среднее арифметическое значение оспин для каждого разведения. При постановке реакции нейтрализации используют то разведение стандартного образца,-которое дает на ХАО куриных эмбрионов 40 – 60 оспин (рабочее разведение). Готовят двукратные разведения исследуемых сывороток на ФЦБ растворе Мак-Ильвейна от 1:10 до 1:640 и разведения нормальной сыворотки 1:10 и 1:20 в

объёме по 0,5 – 1 мл. К каждому разведению сыворотки добавляют равный объем вируса в рабочем разведении. При этом разведение сывороток увеличивается вдвое. Соответственно в смесях получают разведения исследуемых сывороток от 1:20 до 1:1280 и нормальной сыворотки 1:20 – 1:40. Смеси выдерживают при температуре (37 ± 1) °С в течение 2 ч. На ХАО КЭ наносят по 0,1 мл смеси, используя для каждой смеси по 5 – 6 эмбрионов. Инкубацию и вскрытие эмбрионов проводят так же, как при определении специфической безопасности.

Учет результатов. Подсчитывают количество развившихся на ХАО оспин и определяют их среднеарифметическое значение для каждого разведения сыворотки. Находят среднеарифметическое значение числа оспин, развившихся при исследовании 2 разведений нормальной сыворотки. Титром ВНА считают конечное разведение иммунной сыворотки, дающее нейтрализацию 50 % и более оспин от среднеарифметического числа, определенного в контроле с нормальной сывороткой. Допускается разброс вируснейтрализующих титров сывороток от 1:20 до 1:1280.

Пример расчета СГТ ВНА. При выявлении в реакции нейтрализации следующих титров ВНА в сыворотках 1:20, 1:80, 1:640, 1:640, 1:160, 1:160 для удобства расчета СГТ необходимо все значения привести к единому знаменателю (1:160 = 4:640, 1:80 = 8:640, 1:20 = 32:640), тогда:

$$\text{СГТ ВНА} = \sqrt[6]{\frac{32}{640}\cdot\frac{8}{640}\cdot\frac{1}{640}\cdot\frac{1}{640}\cdot\frac{4}{640}\cdot\frac{4}{640}} = \frac{\sqrt[6]{4096}}{\sqrt[6]{640^6}} = \frac{4}{640} = \frac{1}{160}.$$

Производственный штамм. Штамм Л-ИВП, полученный путем накожных пассажей на кроликах и телятах вакцины, изготовленной из штамма *Lister* института Листера (Великобритания) контролируется на предприятии-изготовителе при получении каждой генерации посевного вируса.

Растворитель, выпускаемый в комплекте с препаратом

Растворитель – 0,9 % раствор натрия хлорида.

Описание. Прозрачная бесцветная жидкость.

Подлинность. Растворитель дает характерную реакцию на хлориды (образуется белый творожистый осадок). Определение проводят одновременно с количественным определением в соответствии с ОФС «Определение хлоридов методом обратного осадительного титрования в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Растворитель дает характерную реакцию на ионы натрия: 5 мл растворителя, упаренные до 1 мл, дают характерную реакцию на ионы натрия (окрашивание пламени в желтый цвет).

Прозрачность. Должен быть прозрачным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Цветность. Должен быть бесцветным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

pH. От 5,5 до 7,5. Испытания проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и в глазных лекарственных формах».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Бактериальные эндотоксины. Предельное содержание бактериальных эндотоксинов в растворителе должно быть не более 0,25 ЕЭ/мл. Определение проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

Стерильность. Должен быть стерильным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Стерильность», если в нормативной документации нет иных указаний.

Количественное определение. В 1 мл растворителя должно быть от 0,0087 до 0,0093 г натрия хлорида. Определение проводят в соответствии с

ОФС «Определение хлоридов методом обратного осадительного титрования в биологических лекарственных препаратах».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С. Допускается однократное кратковременное (не более 24 ч) транспортирование при температуре от 9 до 20 °С.

Вакцина оспенная эмбриональная живая, таблетки жевательные для орального применения

ФС.3.3.1.0035.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину оспенную эмбриональную живую, таблетки жевательные для орального применения. Вакцина представляет собой вирус вакцины, выращенный в хорионаллантоисной оболочке (ХАО) и плодике куриного эмбриона (КЭ), и высушенный со стабилизатором без консерванта. В таблетке содержится вируссодержащий материал и вспомогательные вещества, разрешенные к медицинскому применению.

Вакцина оспенная эмбриональная живая предназначена для профилактики натуральной оспы и заболеваний, вызываемых вирусами оспы животных, патогенными для человека.

ПРОИЗВОДСТВО

Все этапы производства вакцины должны осуществляться с соблюдением установленных требований к правилам организации производства и контролю качества лекарственного препарата, гарантирующих его качество и безопасность для человека.

Производство вакцины оспенной эмбриональной живой должно проводиться в отдельных изолированных помещениях, в которых не допускается производство других лекарственных средств. Условия производства должны соответствовать требованиям Санитарных правил «Безопасность работы с

микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Основные этапы производства:

- получение вируссодержащего материала путем введения посевного вируса на ХАО КЭ;
- инкубирование инфицированных эмбрионов, извлечение плодика и ХАО из эмбриона;
- гомогенизация материала;
- приготовление жидкой вакцины и добавление стабилизатора;
- лиофильная сушка материала;
- подготовка и расчет вспомогательных веществ для получения таблеток;
- прессование таблеток.

Характеристика материалов животного происхождения, используемых в производстве. В качестве продуцента для производства вакцины и посевного материала используют 12-суточные куриные эмбрионы пород «Леггорн», «Роменбраун», «Родонит», «Изобраун», «Русская белая», кросс 46, линия П4, П6. Яйца куриные инкубационные получают из птицехозяйств, свободных от вирусных и других заболеваний, патогенных для человека.

Требования к производственному штамму. Для производства вакцины оспенной эмбриональной живой используют штамм вируса осповакцины БИЭМГ (Б–51). Для приготовления вакцины используется посевной вирус первых 10 пассажей.

Штамм должен отвечать следующим требованиям:

– формировать на ХАО КЭ два вида (специфических образований) оспин: не менее 80 % белых плотных оспин размером 1 – 5 мм («белый» клон) и не более 20 % сероватых расплывчатых поверхностных оспин размером 1 – 3 мм («серый» клон);

– при культивировании на ХАО КЭ при температуре (37 ± 1) °С в течение (42 – 48) ч вирус вакцины должен накапливаться в концентрации 10^8 ООЕ/мл (ООЕ – оспообразующие единицы);

– не вызывать некроз кожи кроликов при внутрикожном введении в дозе 10^4 ООЕ в 0,1 мл;

– не вызывать гибели кроликов при внутримозговом введении в дозе 10^6 ООЕ в 0,1 мл;

– быть безвредным (нетоксичным) для морских свинок и белых мышей в дозах соответственно $3 \cdot 10^7$ и $1,2 \cdot 10^6$ ООЕ/мл при подкожном введении.

Допустимое количество микроорганизмов в пересчете на 1 мл:

– общее число аэробных бактерий – не более 10^3;

– общее число грибов – не более 10^2;

– должны отсутствовать *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Таблетки жевательные круглые двояковыпуклые с риской и цельными краями диаметром 8 – 13 мм светло-коричневого цвета с запахом ванили. Определение проводят органолептически. По внешнему виду таблетки должны соответствовать требованиям ОФС «Таблетки».

Подлинность. Вакцина должна вызывать на хорионаллантоисных оболочках 12-суточных КЭ характерные специфические образования (оспины) 2 видов: не менее 80 % белых плотных оспин размером 1 – 5 мм («белый» клон), не более 20 % расплывчатых сероватых поверхностных оспин размером 1 – 3 мм («серый» клон). Контроль проводят одновременно с определением специфической активности (раздел «Специфическая активность»).

Средняя масса и отклонение от средней массы. От 0,2 до 1 г. Определение проводят в соответствии с ОФС «Таблетки».

Распадаемость. Должны распадаться в течение 1 ч. Определение проводят в соответствии с ОФС «Распадаемость таблеток и капсул».

Потеря в массе при высушивании. Не более 3,0 %. На 2 параллельных анализа используют не менее 7 таблеток. Определение проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Микробиологическая чистота. Допустимое количество в пересчете на 1 г таблеток:

– общее число аэробных бактерий – не более 10^3;

– общее число грибов – не более 10^2;

– должны отсутствовать *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.

Определение проводят по ОФС «Микробиологическая чистота». Масса исследуемых таблеток должна быть не менее 3 г. Таблетки в асептических условиях помещают в фарфоровую ступку с пестиком, растирают и суспендируют в 0,004 М стерильном фосфатно-цитратном буферном (ФЦБ) растворе Мак-Ильвейна в соотношении 1:10 (1 г в 10 мл).

Примечания

Приготовление ФЦБ раствора Мак-Илвейна 0,004 М (pH 7,2 – 7,4). Готовят растворы 1 и 2.

Раствор 1: Растворяют 2,1 г лимонной кислоты в 100 мл воды очищенной.

Раствор 2: В мерной колбе вместимостью 1000 мл в воде очищенной растворяют 28,4 г динатрия гидрофосфата безводного или 35,6 г динатрия гидрофосфата дигидрата или 71, 6 г динатрия гидрофосфата додекагидрата, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Смешивают 2 мл раствора 1 и 18 мл раствора 2 в мерной колбе вместимостью 1000 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Полученный раствор должен иметь pH 7,2 – 7,4. Если pH полученного раствора более 7,4, его доводят до нормы раствором 1. В случае, если pH полученного раствора меньше 7,2, приготовление раствора повторяют. Буферный раствор стерилизуют при температуре (120 ± 1) °С и давлении (0,1 ± 0,01) МПа в течение 8 – 30 мин (в зависимости от объема) или фильтруют через мембраны с диаметром пор 0,22 мкм и хранят при температуре от 2 до 8 °С. Срок хранения от 10 до 30 сут в зависимости от способа укупорки флаконов (способ укупорки флаконов должен быть указан в нормативной документации).

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичен для морских свинок массой 250 – 300 г и белых мышей массой 18 – 20 г при подкожном введении 1 и 1/25 прививочной дозы соответственно. Испытания проводят по ОФС «Аномальная токсичность».

Для определения токсичности используют не менее 4 таблеток. Таблетки растирают в стерильной ступке и суспендируют в 0,9 % стерильном растворе натрия хлорида из расчета 5 мл на таблетку. После отстаивания в течение 45 – 60 мин вводят 5 мл надосадочной жидкости (по 2,5 мл в каждый бок) 2 морским свинкам и по 0,2 мл 5 беспородным белым мышам в холку. Наблюдение за животными проводят в течение 7 сут. В случае развития абсцесса или гибели хотя бы 1 животного производят повторный анализ на удвоенном количестве животных. Если при повторном анализе вновь регистрируются вышеперечисленные явления, серию препарата бракуют.

Специфическая активность. Одна прививочная доза препарата должна содержать не менее $1 \cdot 10^6$ и не более $3 \cdot 10^7$ ООЕ вируса вакцины.

Испытания проводят биологическим методом на ХАО 12-дневных КЭ от кур породы «Леггорн», «Роменбраун», «Родонит-2», «Изобраун» или «Хайсек», или пород кур, эмбрионы которых чувствительны к вирусу осповакцины. Объем выборки составляет не менее 7 прививочных доз (4 таблетки).

Куриные эмбрионы получают из хозяйств, свободных от вирусных и других возбудителей, патогенных для человека.

Подготовка КЭ. Проводят овоскопию КЭ в затемненном помещении. Каждый эмбрион просматривают в направленном пучке света. Свет должен падать сверху на тупой конец яйца. Яйцо с погибшим эмбрионом или с кровоизлиянием под оболочкой бракуют. В центре воздушного мешка на тупом конце яйца и на боковой поверхности яйца, на участке между сосудами и их ответвлениями карандашом делают отметку. В местах отметок с соблюдением правил асептики пропиливают бормашиной с абразивным диском отверстия (щели) длиной 3 – 4 мм и шириной 1,5 мм, не повреждая оболочки. Яйцо укладывают так, чтобы отверстие на боковой стороне было обращено вверх. Подскорлупную оболочку в центре воздушного мешка прорывают плоской полукруглой хирургической иглой. Затем на отверстие, расположенное на боковой поверхности, вносят 0,1 мл стерильного 0,004 М раствора

ФЦБ Мак-Илвейна, подогретого до температуры (50 ± 5) °С, и той же иглой осторожно продавливают подскорлупную оболочку. После этого практически вся капля раствора проходит под подскорлупную оболочку и частично отслаивает ХАО.

Из отверстия (в месте пропила) в центре воздушного мешка резиновой грушей осторожно отсасывают воздух до полного опускания ХАО. Яйца с опущенной ХАО помещают на лотки отверстием на боковой поверхности вверх и помещают в камеру с температурой (37 ± 1) °С. Через 2 ч проводят овоскопию и бракуют эмбрионы с кровоизлияниями и воздушными мешками под ХАО или без воздушных мешков.

Приготовление десятикратных разведений. Таблетки взвешивают с точностью до 0,001 г, растирают в фарфоровой ступке и добавляют стерильный ФЦБ из расчета 10 мл на 1 г таблеток (соотношение 1:10 – «исходное разведение пробы»). В полученной взвеси дают отстояться грубым частицам в течение 45 мин. Из надосадочной жидкости пробы готовят 2 параллельных ряда последовательных десятикратных разведений. С этой целью отбирают по 0,5 мл испытуемого образца и вносят в 2 пробирки, содержащие 4,5 мл стерильного ФЦБ, получают разведение 10^{-1}. Содержимое пробирок перемешивают с помощью пипеток не менее 30 раз. Из каждой пробирки с разведением 10^{-1} по 0,5 мл разведенного материала пипеткой переносят в последующую пробирку с 4,5 мл ФЦБ, не касаясь жидкости пипеткой, получают разведение 10^{-2}, и т.д. до разведения 10^{-5}, меняя пипетки после каждого разведения.

Примечание

В используемый ФЦБ (раздел «Микробиологическая чистота») добавляют бензилпенициллин калия или натрия и стрептомицина сульфат из расчета 250 ед. активности каждого антибиотика в 1 мл ФЦБ.

Инфицирование КЭ. Для инфицирования КЭ используют разведения вакцины 10^{-3}, 10^{-4} и 10^{-5}, предварительно объединенные из 2 параллельных рядов. Каждое разведение материала вводят на ХАО 15 КЭ по (0,10 ± 0,05)

мл в отверстие на боковой поверхности яйца. Круговым вращением яйца вирус равномерно распределяют по ХАО. Инокулированные эмбрионы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 42 – 48 ч. По окончании инкубации КЭ вскрывают, изолируют ХАО, промывают её в воде, раскладывают на темном фоне и подсчитывают количество оспин на ХАО для каждого разведения. Из испытания исключают КЭ с поврежденной ХАО и погибшие.

Учет результатов. Вычисляют среднее арифметическое количество оспин на ХАО КЭ, инфицированных разведением вакцины, вызвавшим образование не менее 10 оспин (допускается расчет по максимальному разведению, содержащему не менее 80 % таких КЭ).

Расчет специфической активности (*А*) в ООЕ проводят по формуле:

$$A = 10 \cdot \frac{B}{C \cdot d \cdot e},$$

где: 10 – коэффициент исходного разведения пробы;

В – среднее арифметическое количество оспин на ХАО КЭ;

С – разведение исходной пробы;

d – объем инокулята, вводимого в КЭ;

е – количество таблеток (доз) в 1 г анализируемого образца.

Для определения чувствительности КЭ к вирусу вакцины параллельно с определением специфической активности на той же партии КЭ проводят определение специфической активности стандартного образца (СО) активности специфичности и некротической активности оспенной вакцины в соответствии с инструкцией по применению. На каждое разведение используют 15 КЭ.

Если полученная величина специфической активности СО отличается от указанной в паспорте, то вычисляют поправочный коэффициент ($К_п$) чувствительности данной партии КЭ к вирусу вакцины по формуле:

$$K_n = \frac{A_c}{A_1},$$

где: $А_с$ – специфическая активность СО, указанная в паспорте, ООЕ/мл;

A_1 – полученная специфическая активность СО, ООЕ/мл.

Результаты определения специфической активности испытуемой серии препарата умножают на поправочный коэффициент $K_п$.

Производственный штамм. Для приготовления вакцины используется посевной вирус первых 10 пассажей. Штамм вируса осповакцины БИЭМГ (Б–51) контролируется на предприятии-изготовителе на каждом пассажном уровне.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С.

Вакцина паротитная культуральная живая, лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения

ФС.3.3.1.0036.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину паротитную культуральную живую, лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения, представляющую собой препарат, содержащий аттенуированный вакцинный штамм вируса паротита Ленинград-3 (Л-3), выращенный на первичной культуре фибробластов эмбрионов перепелов (ФЭП).

Вакцина предназначена для плановой и экстренной профилактики эпидемического паротита.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство вакцины паротитной культуральной живой должно осуществляться с соблюдением установленных требований к правилам надлежащей организации производства и контроля качества лекарственных препаратов на всех этапах производства, в основе которого заложена система посевных вирусов.

В качестве субстрата для накопления вируса используют первичную культуру ФЭП.

Производство вакцины должно обеспечивать стабильность показателей качества готового продукта.

Качество исходного сырья и материалов, используемых в производстве, должно быть подтверждено соответствующими документами.

Одна прививочная доза препарата (0,5 мл) содержит:

– активный компонент: вирус паротита – не менее 20 000 (4,3 lg) тканевых цитопатогенных доз ($ТЦД_{50}$);
– вспомогательные вещества: стабилизатор, состав и количество которого указывают в нормативной документации.
– антибиотик – гентамицина сульфат – не более 20 мкг, если нет других указаний в нормативной документации.

Производственный штамм

Производственный штамм – вируссодержащая жидкость, приготовленная путем пассирования вакцинного штамма вируса паротита в производственном клеточном субстрате. Производственный штамм должен быть идентифицирован с помощью документов, которые должны включать сведения о происхождении штамма, методе аттенуации и уровне пассажа, на котором аттенуация была подтверждена результатами клинических испытаний. С помощью соответствующих лабораторных методов и клинических испытаний на восприимчивых к эпидемическому паротиту людях должно быть доказано, что штамм вируса эпидемического паротита, используемый в производстве вакцины, безопасен и иммуногенен.

Производственный штамм вируса паротита, приготовленный из вакцинного штамма Л-3, депонирован в официальной Государственной коллекции вирусов.

Производственный штамм должен отвечать следующим требованиям:

– быть специфичным;
– обладать генетической стабильностью;
– иметь специфическую активность не ниже 3,5 $lgТЦД_{50}$/0,5 мл;
– быть стерильным: не содержать бактерий, грибов, микоплазм, микобактерий туберкулеза и посторонних вирусов;
– должен обладать репродуктивной активностью: вызывать специфическую дегенерацию в чувствительных культурах клеток, сопровождающуюся

накоплением вируса в питательной среде;

– не обладать аномальной токсичностью;

–не обладать остаточной нейровирулентностью при интрацеребральном введении обезьянам;

– не быть контагиозным;

– потеря в массе при высушивании должна быть не более 2,0 %;

– должен сохраняться в лиофилизированном виде при температуре минус (60±10) °С.

По указанным показателям должна быть проверена каждая новая серия производственного штамма.

Производственный штамм в процессе хранения должен быть проверен на генетическую стабильность (не реже 1 раза в 5 лет).

Примечание

Испытание производственного штамма, посевного вируса, клеточной культуры, сыворотки крупного рогатого скота на присутствие микоплазм должно проводиться двумя методами: цитохимическим и микробиологическим. Испытание на присутствие микоплазм в вирусных сборах, нерасфасованной вакцине и в готовом продукте следует проводить микробиологическим методом.

Посевной вирус

Посевной вирус – вируссодержащая жидкость, полученная путем однократного пассирования промежуточного пассажа производственного штамма на производственном субстрате; служит в качестве посевного материала для изготовления вакцины. Посевной вирус должен обладать теми же характеристиками, что и штамм, из которого он получен. Каждая серия посевного вируса должна быть идентифицирована как вирус эпидемического паротита с помощью соответствующих методов.

Каждая серия посевного вируса должна быть проверена на остаточную нейровирулентность, что определяют в тесте на обезьянах по ОФС «Оценка специфической безопасности производственных штаммов и посевных вирусов кори, паротита и краснухи».

Требования к специфической безопасности вакцины касаются не только отсутствия остаточной нейровирулентности, но также и наличия генетической стабильности производственного штамма и посевных серий. Следует оценивать генетическую стабильность новых посевных серий вируса паротита так же, как и новых серий производственного штамма. Сравнительный анализ секвенированных последовательностей генома вируса в указанных производственных материалах должен подтвердить их идентичность структуре вакцинного штамма.

Методы культивирования должны обеспечивать сохранение иммуногенных свойств готового препарата, его безопасность и предотвращать контаминацию посторонними вирусами, бактериями, грибами и микоплазмами.

Пассажный уровень вируса в готовом препарате должен быть ограничен. Допускается пассирование производственного штамма и посевных вирусов в культуре ФЭП с таким расчетом, чтобы готовая вакцина содержала вирус, прошедший не более 10 пассажей от вакцинного штамма.

Особое внимание уделяют обеспечению стабильности таких параметров, как множественность заражения и условия культивирования (продолжительность и температура инкубации).

Рекомендуется хранить большой объем серии посевного вируса в качестве основного материала, который изготовитель должен использовать для производства коммерческих серий вакцины. Серии посевного вируса в лиофилизированном виде следует хранить при температуре ниже минус 20 °С, а в нелиофилизированном виде – при температуре ниже минус 60 °С.

Клеточный субстрат, используемый для производства

Субстратом для размножения и накопления вируса паротита является первичная культура ФЭП. Оплодотворенное перепелиное яйцо должно быть получено от птиц, которые содержатся в изолированных специализированных хозяйствах, свободных от вирусов лейкоза птиц и других микроорганизмов, патогенных для птиц. Птиц в этих хозяйствах постоянно контролируют на отсутствие аденовируса птиц 1-ой, 3-ей и 4-ой групп, энцефаломие-

лита птиц, гриппа птиц типа А, парамиксовируса, реовируса, пневмовируса, оспы и туберкулеза птиц, вируса анемии цыплят, инфекционного бронхита, бурсита и ларинготрахеита, лейкоза и микоплазмоза птиц, вирусов лимфоидного лейкоза, болезни Марека и Ньюкастла, гемофильной инфекции, сальмонеллеза, пастереллеза, орнитоза и др. инфекционных заболеваний птиц.

При культивировании клеток не допускается использование нативной сыворотки крови человека.

Питательная среда для клеток может содержать pH индикатор, например, феноловый красный, а также разрешенные антибиотики в минимальной эффективной концентрации. Не допускается использование пенициллина и стрептомицина.

Материалы от животных, которые используют при производстве вакцины, получают из хозяйств, благополучных в отношении бактериальных, вирусных, прионовых и других заболеваний, опасных для человека. Сыворотка крови крупного рогатого скота должна быть получена от животных из стада, в котором отсутствуют такие заболевания, как спонгиформная энцефалопатия и лейкоз крупного рогатого скота. Трипсин, используемый для приготовления клеточной культуры, не должен содержать микоплазм, цирко- и парвовирусов свиней, а также должен быть испытан на отсутствие контаминации бактериями и грибами.

Вещества, вносимые в препарат

К веществам, вносимым в препарат, относят сыворотку крови крупного рогатого скота, которая используется для выращивания клеточной культуры. Сыворотка должна быть испытана на отсутствие контаминации вирусами, бактериями, грибами, микоплазмами.

Сыворотка крови животных должна быть удалена после инокуляции культуры клеток посевным вирусом. Перед сбором вируса культуру клеток отмывают, и ростовую среду заменяют бессывороточной поддерживающей средой. Наличие остаточного количества бычьего сывороточного альбумина

(БСА) не должно превышать 50 нг в одной прививочной дозе (0,5 мл). Определение проводят иммунохимическим методом на образце готовой серии.

Испытания на этапах производства

В процессе производства проводят исследование на присутствие контаминантов в культуральной жидкости, собранной с культур контрольных клеток, в образцах индивидуальных вирусных сборов и в образцах объединенных вирусных сборов. Индивидуальные вирусные сборы контролируют на стерильность и специфическую активность. Объединенные вирусные сборы контролируют на стерильность, присутствие микоплазм, микобактерий, посторонних вирусов, содержание белка, интактных клеток, специфическую активность. В готовой жидкой нерасфасованной вакцине проверяют специфическую активность, стерильность, присутствие микоплазм.

При производстве вакцины особое значение имеет постоянное выполнение на всех этапах производства внутрипроизводственного анализа основных показателей качества и анализа качества готовой продукции при выпуске.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Лиофилизат – однородная пористая масса. Цвет лиофилизата указывают в нормативной документации. Определение проводят визуально.

Восстановленный препарат – прозрачная жидкость. Цветность восстановленного препарата указывают в нормативной документации. Определение проводят визуально.

Подлинность. Должен содержать вирус паротита. Определяют в реакции нейтрализации на культуре клеток *Vero*. Подлинность вируса паротита в вакцине устанавливают на основании нейтрализации цитопатогенного действия (ЦПД) вируса паротита специфической иммунной сывороткой, содержащей антитела к вирусу паротита. В реакции используют аттестованный стандартный образец паротитных антител.

Время растворения. Вакцина должна растворяться в течение 3 мин при внесении в ампулу 0,5 мл растворителя для вакцины на дозу. Определение проводят визуально.

Механические включения. Восстановленный препарат должен соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парэнтерального применения и в глазных лекарственных формах»

pH (восстановленного препарата**).** От 7,2 до 7,8, если нет других указаний в нормативной документации. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС « Ионометрия».

Потеря в массе при высушивании. Не более 2,0 %. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС **«**Потеря в массе при высушивании».

Бычий сывороточный альбумин. Не более 50 нг в одной прививочной дозе. Определение проводят подходящим количественным иммунохимическим методом, указанным в нормативной документации.

Стерильность. Препарат не должен содержать бактерий и грибов. Определяют методом прямого посева или мембранной фильтрации с использованием тиогликолевой среды при двух температурных режимах в соответствии с ОФС «Стерильность».

Присутствие микоплазм. Препарат не должен содержать микоплазм**.** Определяют микробиологическим методом, в соответствии с ОФС «Испытание на присутствие микоплазм». Если при испытаниях на присутствие микоплазм сырья и материалов при входном контроле и на всех контрольных точках в технологическом процессе контаминация микоплазмами надлежащими методами не обнаружена, то испытание готовой серии препарата на присутствие микоплазм может не проводиться.

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичным. Испытание проводят биологическим методом на белых мышах и на морских свинках обоего пола. Животным вводят по одной прививочной дозе препара-

та в объеме 0,5 мл внутрибрюшинно, если нет других указаний в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

Специфическая активность. Прививочная доза (0,5 мл) должна содержать не менее 20000 (4,3 lg) $ТЦД_{50}$ вируса паротита. Титр вируса определяют в каждой из 5 ампул серии готового препарата по ЦПД вируса на культуре клеток *Vero*. Каждый образец вакцины должен иметь специфическую активность не ниже регламентированной, в противном случае проводят повторный контроль специфической активности дополнительных 5 образцов, результат которого считают окончательным. Минимально регламентированное содержание вируса в прививочной дозе должно сохраняться в течение всего срока годности.

Одновременно с определением титра вируса в образцах серии проводят титрование стандартного образца (СО) активности вируса паротита. Одну ампулу стандартного образца титруют три раза для подтверждения достоверности каждого количественного определения активности.

Учет результатов проводят по ЦПД с помощью инвертированного микроскопа (увеличение: объектив 10× – окуляр 10×) в сроки, указанные в нормативной документации.

Наибольшее разведение вакцины, вызывающее ЦПД в 50 % лунок с зараженной клеточной культурой, принимают за титр вируса. Титр вируса в вакцине рассчитывают по методу Рида и Менча или Спирмена-Кербера.

При титровании вакцины в лунки планшетов вносят по 0,1 мл каждого разведения вакцины, т.е. объем, в 5 раз меньший, чем объем прививочной доза. Для расчета активности вируса в прививочной дозе к титру вируса, рассчитанному в lg $ТЦД_{50}$/0,1мл, добавляют постоянную величину, равную lg 5, т.е. 0,7.

Критерии приемлемости результатов:

– диапазон доверительного интервала (P=0,95) среднего значения титра СО, определенного при трехкратном титровании 1 ампулы, должен быть в пределах ± 0,3 lg $ТЦД_{50}$;
– титр вируса в СО не должен отличаться более, чем на 0,5 lg $ТЦД_{50}$ от аттестационного значения.

Термостабильность. Препарат должен быть термостабильным. Испытание проводят, определяя специфическую активность при одновременном титровании 5 образцов вакцины, инкубированных при температуре (37 ± 1) °С в течение 7 сут и 5 образцов вакцины, хранившихся при температуре от 2 до 8 °С. Препарат считают прошедшим испытание, если средняя геометрическая величина титра вируса образцов после прогревания снижается не более, чем на 1 lg .

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Дополнительная информация: субстрат культивирования вируса и предупредительные надписи: «Хранить при температуре от 2 до 8 °С в недоступном для детей месте», «Избегать контакта вакцины с дезинфицирующими средствами».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С.

Вакцина полиомиелитная пероральная, моновалентная, живая аттенуированная 2 типа, раствор для приема внутрь	ФС.3.3.1.0037.18 Взамен ФС.3.3.1.0037.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину полиомиелитную пероральную, моновалентную 2 типа, раствор для приема внутрь.

Вакцина представляет собой препарат из аттенуированных штаммов Сэбина P712 Ch 2ab вируса полиомиелита 2 типа, выращенного на первичной культуре клеток почек африканских зеленых мартышек (КПЗМ) или на первичной культуре клеток почек африканских зеленых мартышек с одним пассажем на перевиваемой культуре клеток линии *Vero* и содержит 2-й тип вируса в виде раствора с 0,5 % гидролизата лактальбумина в растворе Эрла. Вакцина выпускается в лекарственной форме, пригодной для приема внутрь.

Препарат предназначен для профилактики полиомиелита.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство пероральной полиомиелитной моновакцины основано на применении клеточных линий для размножения и определения активности вируса. Все этапы производства вакцины должны осуществляться с соблю-

дением установленных требований организации производства и контроля качества лекарственного препарата, гарантирующих качество и безопасность для человека.

В состав вакцины полиомиелитной пероральной, моновалентной 2 типа, раствор для приема внутрь входят: действующие вещества: (количество инфекционных единиц (ИЕ) вируса, выраженных в тканевых цитопатогенных дозах ($ТЦД_{50}$)- вирус полиомиелита, аттенуированный штамм Сэбина тип 2 – не менее $10^{5,0}ТЦД_{50}$ и вспомогательные вещества: стабилизатор, антибиотик и среда гидролизат.

Производственные штаммы. Используется производственный штамм Сэбина вируса полиомиелита: тип 2 – P712 Ch 2ab. Рабочие посевные серии вируса полиомиелита используют для производства вакцины на первичной культуре клеток почек зеленой мартышки или на первичной культуре клеток почек африканских зеленых мартышек с одним пассажем на перевиваемой культуре клеток линии *Vero.* Рабочие посевные серии готовят из основного посевного вируса тип 2 с использованием не более трех пассажей.

Основной и рабочий посевные серии должны быть стерильны, иметь титр не менее 10^7 ИЕ в 1 мл, быть типоспецифичны, иметь характеристику по генетическому маркеру rct/40, соответствующую аттенуированным штаммам, авирулентны.

Основной (прототипный) штамм предоставляется ВОЗ. Рабочий посевной вирус изготовленный из оригинального аттенуированного штамма P712 Ch 2ab вируса полиомиелита 2 типа должен проходить испытания на соответствие требованиям не реже, чем 1 раз в год по основным показателям: стерильность, специфическая активность, генетический признак rct/40.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачная жидкость от желтовато-красного до розово-малинового цвета, без осадка, без видимых посторонних включений. Метод

определения визуальный.

Подлинность. Вакцина должна быть типоспецифичной и содержать аттенуированный штамм Сэбина тип 2. Определение проводят в реакции нейтрализации цитопатогенной активности вакцины соответствующей гомотипичной диагностической энтеровирусной сывороткой 2-го типа в культуре клеток Hep-2 Цинциннати параллельно со стандартным образцом (СО). Рабочее разведение гомотипичной сыворотки 2-го типа должно снижать титр вируса не менее чем на 2 lg (не менее чем в 100 раз).

Подготовку культуры клеток проводят по методике, описанной в разделе «Специфическая активность».

Титрование проводят в 96-луночных панелях для культивирования клеток фирмы «Costar» или изготовленных другими фирмами аналогичного качества.

Разведения вакцины и СО готовят на питательной среде Игла МЕМ, содержащей 2 % сыворотки крови плодов коров кратностью $1 \cdot 5$.

В каждую лунку панели вносят по 0,05 мл выбранных разведений вакцины или СО и 0,05 мл рабочего разведения сыворотки 2-го типа (по 8 – 12 лунок на разведение), и инкубируют 3 ч при температуре (37±1) °С. Затем во все лунки панели добавляют по 0,1 мл взвеси клеток в концентрации 100000 – 200000 клеток в мл. В контрольные лунки вносят по 0,1 мл клеточной суспензии и 0,1 мл питательной среды. Панели инкубируют в термостате при температуре (37±1) °С в газовой среде, содержащей 5 % CO_2 – в течение 7 сут. Клетки Hep-2 в лунках панели просматривают в инвертированном микроскопе на наличие цитопатогенного действия на 3, 5 и 7 дни инкубирования. $ТЦД_{50}$ /мл вируса высчитывают на 7 день по методу Рида и Менча.

Прозрачность. Вакцина должна быть прозрачной. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей». Испытание проводят визуально.

Цветность. Вакцина должна быть от желтовато-красного до розово-

малинового цвета. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкости». Испытания проводят визуально.

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

pH. От 6,8 до 7,2. Испытания проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Стерильность. Вакцина должна быть стерильна (метод прямого посева или мембранной фильтрации). Испытания проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Специфическая активность. Вакцина полиомиелитная пероральная тип 2 должна содержать в одной прививочной дозе (0,2 мл) инфекционных единиц (ИЕ) вируса ($ТЦД_{50}$) – не менее $10^{5,0}$ (100 000). Определение специфической активности проводят на культуре клеток Нер-2 (Цинциннати) по цитопатогенному действию (ЦПД) вируса в сравнении с СО.

Исходные клетки Нер-2 Цинциннати, поддерживают многократным пассированием в питательной среде Игла МЕМ с добавлением 5 % сыворотки крови плодов коровы, содержащей гентамицина сульфат 40 мкг/мл.

При пассировании клеточных культур клетки снимают с поверхности стекла смесью растворов трипсина и версена (1·1), подогретых до температуры 37 °С и засевают в количестве от $1 \cdot 10^4$ до $3 \cdot 10^4$ клеток на 1 $см^2$ площади одной из боковых сторон флакона и выращивают при температуре (37±1) °С. Клеточный монослой формируется на 3 – 4 сут.

Титрование проводят в 96-луночных панелях для культивирования клеток фирмы «Costar» или изготовленных другими фирмами аналогичного качества.

В каждое испытание наряду с исследуемым образцом включают одновременное титрование СО моновакцины. Разведения вакцины и СО готовят на питательной среде Игла МЕМ, содержащей 2 % сыворотки крови плодов

коров кратностью 1·5. Диапазон разведений должен включать, по меньшей мере, три разведения препаратов, при которых вирус разрушает от 10 % до 90 % зараженных клеток. В каждую лунку панели вносят по 0,1 мл выбранных разведений вакцины или СО (по 8 – 12 лунок на разведение). Затем во все лунки панели добавляют по 0,1 мл взвеси клеток в концентрации 100000 – 200000 клеток в мл. В контрольные лунки вносят по 0,1 мл клеточной суспензии и 0,1 мл питательной среды. Панели инкубируют в термостате при температуре (37±1) °С в газовой среде, содержащей 5 % CO_2 – в течение 7 сут. Клетки Нер-2 в лунках панели просматривают в инвертированном микроскопе на наличие цитопатогенного действия на 3, 5 и 7 дни инкубирования. $ТЦД_{50}$ /мл вируса высчитывают на 7 день по методу Рида и Менча.

Титрование каждой серии полиомиелитной моновакцины проводят не менее двух раз, но не более четырех раз.

Учитывают результаты только тех титрований, в которых значение (десятичного) логарифма титра одновременно титруемого с вакциной СО не отличается от среднего значения логарифма титра СО, более чем на 0,5. Вычисляют среднюю арифметическую величину титра из результатов двух титрований вакцины и делают заключение о соответствии или несоответствии вакцины требованиям, предъявляемым к специфической активности препарата. Повторные титрования забракованных серий вакцины не допускаются.

Термостабильность. Должна быть стабильна. Величина титра вируса после прогревания вакцины может снижаться не более чем на 0,5 lg. Не менее 3 флаконов от каждой серии вакцины и СО прогревают при температуре (37±1) °С в течение 48 ч, другие 3 флакона препарата и СО (контроль) хранят при температуре минус 20 °С. Вакцины и СО в прогретых и контрольных образцах титруют одновременно по методике, изложенной в разделе «Специфическая активность». Повторное титрование не допускается (титр определяют в одном опыте).

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологиче-

ские лекарственные препараты» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств» с предупредительными надписями: «Хранить в недоступном для детей месте», «Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений», «Для выращивания вируса используется питательная среда с гидролизатом лактальбумина (0,5 %) в растворе Эрла».

Т**ранспортирование.** При температуре от 2 до 8 °С. В случае хранения вакцины при температуре не выше минус 20 °С допускается размораживание с повторным однократным замораживанием вакцины до температуры минус 20 °С.

Хранение. При температуре от 2 до 8 °С - 6 мес или при температуре не выше минус 20 °С - 2 года.

Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади ФС.3.3.1.0038.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади, который представляет собой белковую гамма-глобулиновую фракцию сыворотки крови лошади, обладающую активностью в отношении вируса бешенства. Препарат в комбинации с вакциной антирабической предназначен для профилактики бешенства по экстренным показаниям.

Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади выпускают в комплекте с иммуноглобулином антирабическим разведенным 1:100, предназначенным для проведения внутрикожной пробы с целью выявления гиперчувствительности к белкам сыворотки крови лошади.

Препараты иммуноглобулина антирабического лошадиного не содержат консервантов и антибиотиков.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади должно осуществляться с соблюдением установленных требований правил организации производства и контроля качества лекарственного препарата, гарантирующих сохранение структуры и функции белков иммуноглобулина, обеспечивающих специфическую и вирусную безопасность препарата и исключающих контаминацию чужеродными агентами.

Иммуноглобулин из сыворотки крови лошади, раствор для инъекций,

получают из плазмы крови лошадей, гипериммунизированных вирусом бешенства. Для иммунизации животных-продуцентов используют производственный штамм фиксированного вируса бешенства «Москва». Для получения очищенной концентрированной гамма-глобулиновой фракции плазмы лошади, содержащей противовирусные антитела, нейтрализующие вирус бешенства, применяют риванол-спиртовой метод.

Производственный штамм вируса бешенства

Производственный штамм фиксированного вируса бешенства «Москва» должен соответствовать следующим требованиям:

Подлинность. Должен нейтрализоваться иммуноглобулином антирабическим из сыворотки крови лошади и не должен нейтрализоваться нормальной сывороткой крови крупного рогатого скота. Индекс нейтрализации должен быть не менее 100.

Для испытания параллельно готовят 2 ряда 10-кратных разведений вируса в диапазоне 1:5 до 1:50000. В качестве среды разведения используют 2 % раствор нормальной лошадиной сыворотки, приготовленный с применением стерильной воды очищенной или воды для инъекций. Сыворотку лошадиную нормальную предварительно инактивируют при температуре 56 ^{o}C в течение 30 мин. Для получения разведений в первую пробирку каждого ряда, соответствующую разведению 1:5, вносят 0,4 мл среды разведения, в остальные пробирки ряда – по 0,45 мл среды разведения. В первую пробирку каждого ряда добавляют по 0,1 мл восстановленной суспензии вируса бешенства штамм «Москва» и тщательно перемешивают содержимое пробирок. Далее готовят ряд последовательных разведений путем переноса 0,05 мл смеси из пробирки с готовым разведением в следующую в ряду пробирку, каждый раз используя новую пипетку (или наконечник автоматической пипетки). Из последней пробирки, соответствующей разведению 1:50000, удаляют 0,05 мл смеси в емкость с дезинфицирующим раствором. В результате конечный объем содержимого каждой пробирки составляет 0,45 мл смеси.

После приготовления разведений вируса в каждую пробирку первого ряда вносят по 0,45 мл иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади; в каждую пробирку второго ряда добавляют по 0,45 мл нормальной сыворотки крови крупного рогатого скота, инактивированной при температуре 56 ^{o}C в течение 30 мин.

В результате получают 2 ряда разведений вируса бешенства штамм «Москва» от 10^{-1} до 10^{-5} в комбинации со специфическими противовирусными антителами (первый ряд) или в смеси с нормальными антителами, не способными нейтрализовать вирус (второй ряд). Содержимое пробирок осторожно перемешивают путем встряхивания и инкубируют при температуре (37 ± 1) ^{o}C в течение (75 ± 15) мин. Затем пробирки охлаждают на льду до комнатной температуры и по 0,03 мл содержимого каждой пробирки вводят интрацеребрально 6 беспородным мышам массой 9 – 10 г. За животными наблюдают 14 дней. Мышей, погибших в течение первых 4 дней, при расчетах не учитывают. Титр вируса, использованного для заражения каждой из 2 групп мышей, вычисляют по методу Рида и Менча. Индекс нейтрализации рассчитывают путем вычитания логарифма обратного разведения, соответствующего LD_{50} вируса в смеси с иммуноглобулином антирабическим лошадиным, из логарифма обратного разведения, соответствующего LD_{50} вируса в смеси с нормальной сывороткой крупного рогатого скота. Если полученная разница превышает 2, то индекс нейтрализации больше 100.

Стерильность. Не должен содержать бактерий, в том числе микобактерий туберкулеза и грибов. Испытание на отсутствие бактерий и грибов проводят в соответствии с ОФС «Стерильность». Испытание на отсутствие микобактерий туберкулеза проводят путем посева на среду Левенштейна-Йенсена.

Присутствие микоплазм. Не должен содержать микоплазм. Испытание проводят микробиологическим методом в соответствии с ОФС «Испытание на присутствие микоплазм».

Посторонние вирусные агенты. Не должен содержать посторонних вирусных агентов по результатам испытания на мышах-сосунках, беспородных белых мышах массой 15 – 20 г, морских свинках массой 350 – 500 г, культурах клеток.

Инфекционный титр вируса. Не менее 10^{-6} LD_{50}/мл при интрацеребральном заражении беспородных белых мышей массой 9 – 10 г и не более $10^{-1,5}$ LD_{50}/мл при внутримышечном и подкожном путях заражения; не менее $10^{-5,0}$ LD_{50}/0,2 мл при интрацеребральном заражении кроликов породы Шиншилла массой 2,5 – 3 кг.

При необходимости проведения пассажа исходного производственного штамма для приготовления антигена для гипериммунизации животных-продуцентов допускается проведение не более 3 пассажей через мозг кролика.

Животные-продуценты

Для иммунизации используют клинически здоровых лошадей без различия пола. При отборе животных-продуцентов не допускается использовать лошадей, прошедших ранее курс гипериммунизации против любых вирусных инфекций. Для производства иммуноглобулина используют сыворотки лошадей с титром не ниже 1:500, определенных в реакции нейтрализации на белых мышах с разрешающей дозой вируса 100 – 500 LD_{50}/0,03мл.

Выделение балластных белков и получение осадка гамма-глобулина

Выделение балластных белков и получение осадка гамма-глобулина с целью его очистки и концентрирования проводят риванол-спиртовым методом.

Вспомогательные вещества

В состав препарата могут входить вспомогательные компоненты, разрешенные к медицинскому применению в дозах, не вызывающих токсические, аллергические или иные нежелательные реакции у человека. В качестве стабилизатора используют глицин.

Испытания промежуточных продуктов на производстве

Сыворотка, полученная от гипериммунизированных животных, должна иметь pH от 7,5 до 7,7. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Надосадочная жидкость после этапа выделения балластных белков проверяется на полноту осаждения риванола: риванол должен отсутствовать. Определение проводят методом флуоресценции.

Фильтрат для выделения гамма-глобулина должен иметь pH от 6,8 до 7,2. Определение проводят потенциометрически в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Жидкий иммуноглобулин испытывают на содержание белка. Содержание белка должно быть в пределах от 9 до 11 %. Определение проводят колориметрическим методом с биуретовым реактивом в соответствии с ОФС ««Определение белка с биуретовым реактивом в препаратах крови человека и животных».

Этап розлива и запайки ампул. По показателю «Герметичность» испытывают все ампулы серии. Для проведения испытания ампулы помещают в кассеты, заполненные водой, подкрашенной любым красителем, растворимым в воде. Кассеты погружают таким образом, чтобы ампулы полностью находились в воде. Емкость с установленными в ней кассетами с испытуемыми ампулами герметично закрывают и создают в ней избыточное, по сравнению с атмосферным, давление (100 ± 20) кПа. Давление выдерживают в течение 20 – 25 мин, после чего устанавливают в емкости давление, равное атмосферному. Емкость открывают, кассеты с ампулами вынимают и просматривают на наличие в них подкрашенной воды. Ампулы, содержащие подкрашенную воду, считают не выдержавшими испытание.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачная или слабо опалесцирующая жидкость от бесцветной до слабо-желтой окраски. Не допускается розовое окрашивание.

Определение проводят визуально.

Подлинность. При испытании определяют следующие параметры подлинности препарата:

1. ***Видоспецифичность.*** Должен обладать видовой специфичностью, свойственной только белкам сыворотки крови лошади. Определение проводят методом кольцепреципитации с использованием коммерческих сывороток, преципитирующих белки сыворотки крови лошади, человека, крупного рогатого скота и свиньи.

Испытуемый образец разводят 0,9 % раствором натрия хлорида в соотношении 1:1000. В 4 стеклянные преципитационные пробирки высотой 6 – 10 мм вносят по 0,4 мл разведенного образца, затем на дно пробирок путем подслаивания под образец медленно вносят по 0,1 мл преципитирующей сыворотки: в первую пробирку – сыворотку, преципитирующую белки сыворотки крови лошади, во вторую пробирку – преципитирующую сыворотку к белкам сыворотки крови человека, в третью пробирку – сыворотку, преципитирующую белки сыворотки крови крупного рогатого скота, в четвертую пробирку – сыворотку, преципитирующую белки сыворотки крови свиньи. Учет результатов проводят визуально при дневном освещении на черном фоне при температуре (20 ± 4) ^{o}C немедленно после выполнения реакции и по истечении 1 ч. Образец считают выдержавшим испытание, если в первой пробирке (с гомологичной сывороткой) образуется кольцо преципитации в течение 1 – 10 мин, и если во второй, третьей, четвертой пробирках (с гетерологичными сыворотками) не образуется кольцо преципитации в течение 1 ч.

2. ***Специфичность антител.*** Должен содержать антитела к вирусу бешенства. Определение проводят в соответствии с разделом «Специфическая активность».

Прозрачность. Прозрачный или слегка опалесцирующий раствор с оптической плотностью не более 0,05. Определение проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» в кюве-

тах с толщиной слоя 3 мм при длине волны 540 нм по сравнению с водой очищенной.

Цветность. Бесцветный или светло-желтый раствор с оптической плотностью не более 0,15. Определение проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» в кюветах с толщиной слоя 3 мм при длине волны 400 нм по сравнению с водой очищенной.

pH. От 6,6 до 7,4. Испытуемый образец разводят до 1 % концентрации 0,9 % раствором натрия хлорида. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

Белок. От 9 до 11 %. Определение проводят колориметрическим методом с биуретовым реактивом в соответствии с ОФС «Определение белка с биуретовым реактивом в препаратах крови человека и животных» Метод А.

Электрофоретическая однородность. Содержание фракции γ-глобулинов должно быть не менее 80 %; фракций α-, β-глобулинов – не более 20 %; фракция альбуминов должна отсутствовать. Определение проводят в соответствии с ОФС ««Определение однородности лекарственных препаратов из сыворотки крови человека и животных методом электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы».

Риванол. Должна отсутствовать характерная для риванола желто-зеленая флуоресценция.

Препарат визуально сравнивают со стандартным раствором, содержащим 0,2 мкг/мл риванола. Для испытания в одну кварцевую кювету толщиной слоя 10 мм вносят препарат иммуноглобулина, в другую – стандартный раствор риванола и помещают в источник УФ-излучения (например, ртутно-

кварцевая лампа). В результате анализа не должна наблюдаться характерная для риванола желто-зеленая флуоресценция.

Примечания

1. Приготовление основного раствора риванола 100 мкг/мл. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 5 мг риванола, растворяют в воде очищенной, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор хранению не подлежит.

2. Приготовление стандартного раствора риванола 0,2 мкг/мл. Перед определением основной раствор риванола разводят в 50 раз водой очищенной (до концентрации 2 мкг/мл). К 0,5 мл полученного раствора добавляют 4,5 мл воды очищенной и перемешивают. Используют свежеприготовленный раствор.

Спирт этиловый. Не более 4,5 %. Определение проводят методом, указанным в нормативной документации, в соответствии с требованиями ОФС «Определение спирта этилового в жидких фармацевтических препаратах».

Стерильность. Должен быть стерильным. Испытание на отсутствие бактерий и грибов проводят методом прямого посева или мембранной фильтрации с использованием тиогликолевой среды в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность. Должен быть апирогенным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Препарат вводят из расчета 1 мл на 1 кг массы тела кролика.

Аномальная токсичность. Должен быть нетоксичным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

Препарат вводят по 1 мл внутрибрюшинно 5 белым мышам массой 17 – 20 г, подкожно 2 морским свинкам массой 250 – 300 г – по 2,5 мл в каждый бок (если нет других указаний в нормативной документации). За животными наблюдают 7 дней.

Специфическая активность. Не менее 150 МЕ/мл. Испытание проводят биологическим методом на беспородных белых мышах или мышах линии *Balb/c* массой (11 ± 1) г.

Специфическую активность испытуемого образца определяют в сравнении со стандартным образцом специфической активности иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади, калиброванным по отношению к международному стандарту специфической активности иммуноглобулина антирабического.

Предварительно испытуемый и стандартный образцы разводят 0,9 % стерильным раствором натрия хлорида (если нет других указаний в нормативной документации) до получения конечного разведения (после добавления разрешающего разведения фиксированного вируса бешенства штамм «CVS») в соотношении 1:500; 1:1000; 1:2000; 1:4000 и т.д. в зависимости от предполагаемой специфической активности испытуемого образца. Разведения образцов для заражения животных указывают в нормативной документации. После этого в каждую пробирку с полученными разведениями добавляют разрешающее разведение вируса бешенства, содержащее от 100 до 500 LD_{50} , в объеме, равном объему испытуемого и стандартного образца. Содержимое пробирок перемешивают путем встряхивания. Расчет разрешающего разведения вируса бешенства для испытания проводят на основании результатов предварительного титрования вируса бешенства (определения инфекционной активности вируса).

Для определения точного количества доз вируса бешенства, взятого в опыт, одновременно с разведениями испытуемого образца готовят разведения вируса бешенства. Разрешающее разведение вируса бешенства смешивают с 2 % раствором нормальной лошадиной сыворотки, приготовленным с применением стерильной воды очищенной или воды для инъекций, в соотношении 1:1. Полученную смесь условно принимают за исходное разведение 10^0 и готовят последовательные десятикратные разведения вируса (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}) в 2 % растворе нормальной лошадиной сыворотки. Сыворотку лошади-

ную нормальную предварительно инактивируют при температуре 56 °С в течение 30 мин.

Пробирки с разведениями испытуемого образца, стандартного образца и фиксированного вируса бешенства штамм «CVS» инкубируют при температуре 37 °С в течение (75 ± 15) мин или при температуре (6 ± 2) ° С в течение (18 ± 1) ч. Затем из каждого полученного разведения смеси вводят интрацеребрально лабораторным животным по 0,03 мл (не менее 10 мышей на каждое разведение испытуемого и стандартного образцов и не менее 10 мышей на каждое разведение фиксированного вируса бешенства штамм «CVS»). За мышами наблюдают в течение 14 сут. При оценке результатов опыта учитывают заболевших или павших животных с 5 по 14 сут.

После окончания опыта вычисляют точное количество вируса, содержавшееся в 0,03 мл разрешающего разведения, по методу Рида и Менча.

Расчет специфической активности антирабического иммуноглобулина производят по следующим формулам:

1) Определяют защитный титр ($КР_{50}$) – разведение, при котором выжило 50 % экспериментальных животных) испытуемого и стандартного образца:

$$T = A + \frac{50 - B}{C - B} \cdot Д,$$

где : *А* – логарифм обратной величины разведения, при котором смертность животных ниже 50 %;
В – показатель смертности ниже 50 %;
С – показатель смертности выше 50 %;
Д – логарифм кратности разведения

$$КР_{50} = 10^{-T}$$

2) Специфическую активность испытуемого иммуноглобулина (СА) определяют в МЕ/мл относительно специфической активности стандартного образца по формуле:

$$CA = \frac{A}{B} \cdot n,$$

Где: A – обратная величина защитного титра испытуемого иммуноглобулина;

B – обратная величина защитного титра стандартного образца;

n – специфическая активность стандартного образца в МЕ.

В случае, если при проведении испытания специфическая активность иммуноглобулина не соответствует нормативным требованиям, допускается проведение повторного испытания.

Иммуноглобулин антирабический, разведенный 1:100

Описание. Прозрачная бесцветная жидкость. Определяют визуально.

Прозрачность. Испытуемый раствор не должен отличаться по своей прозрачности от растворителя, используемого при его приготовлении. Определение проводят визуальным методом в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Цветность. Бесцветный или светло - желтый раствор, не превышающий степень окраски эталона Y_7. Определение проводят визуальным методом в соответствии с ОФС « Степень окраски жидкостей».

pH. От 6,6 до 7,4. Определяют потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Белок. От 0,09 до 0,11 %. Определение проводят колориметрическим методом с биуретовым реактивом в соответствии с ОФС «Количественное определение белка колориметрическим методом с биуретовым реактивом в препаратах крови человека и животных» Метод Б.

Стерильность. Должен быть стерильным. Испытание на отсутствие бактерий и грибов проводят методом прямого посева или мембранной фильтрации с использованием тиогликолевой среды в соответствии с ОФС «Стерильность».

Упаковка и **маркировка.** В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С.

Иммуноглобулин человека противооспенный раствор, для внутримышечного введения	ФС.3.3.1.0039.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на иммуноглобулин человека противооспенный, раствор для внутримышечного введения, применяемый в качестве лекарственного средства для лечения и экстренной профилактики натуральной оспы. Действующим началом препарата являются иммуноглобулины класса G (IgG), обладающие специфической активностью к ортопоксвирусам.

Иммуноглобулин человека противооспенный относится к специфическим иммуноглобулинам направленного действия.

В состав препарата может входить стабилизатор – глицин (аминоуксусная кислота). Его количество должно быть отражено в нормативной документации.

ПРОИЗВОДСТВО

Иммуноглобулин человека противооспенный выделяют из плазмы крови здоровых доноров, предварительно иммунизированных оспенной вакциной в соответствии с инструкцией по применению. Плазма крови здоровых доноров должна соответствовать требованиям ФС «Плазма человека для фракционирования» и содержать антитела к ортопоксвирусам в титре не менее 1:200.

Иммуноглобулин человека противооспенный производится модифицированным методом фракционирования по Кону (метод водно-спиртового

осаждения на холоде). Метод основан на физико-химических отличиях белков и их различной растворимости в присутствии этанола при низких температурах, различной ионной силе, диэлектрической постоянной и pH среды.

Производство иммуноглобулина человека противооспенного должно осуществляться с соблюдением установленных правил организации производства и контроля качества лекарственного препарата, гарантирующих сохранение структуры и функции белков иммуноглобулинов, обеспечивающих специфическую и вирусную безопасность препарата, исключающих его контаминацию чужеродными агентами, а также должно включать стадии производства, обеспечивающие инактивацию и элиминацию инфекционных агентов. Методы очистки и инактивации вирусов указывают в нормативной документации. При инактивации вирусов химическими и фотохимическими методами в нормативной документации производителя необходимо указывать допустимую норму и метод их определения в готовом препарате. Выбор доноров, процессов производства и контроля на производстве иммуноглобулина противооспенного должны соответствовать требованиям ОФС «Иммуноглобулины человека».

Противовирусная эффективность препарата иммуноглобулина человека противооспенного должна быть обеспечена соответствующей степенью концентрации антител в процессе производства (не менее чем в 6 раз при содержании белка в препарате 9 – 11 %).

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачный или слабо опалесцирующий раствор, бесцветный или со светло - желтой окраской, если в нормативной документации не указаны другие требования. В процессе хранения допускается появления незначительного осадка, исчезающего при легком встряхивании. Определение проводят визуально.

Подлинность. При испытании определяют следующие параметры подлинности препарата:

1. ***Видоспецифичность.*** Должен обладать видовой специфичностью, свойственной только белкам сыворотки крови человека. Для определения видоспецифичности белков, входящих в состав препарата иммуноглобулина человека противооспенного, применяют метод иммуноэлектрофореза в геле с использованием сыворотки для иммуноэлектрофореза против белков из сыворотки крови человека, крупного рогатого скота, лошади и свиньи в соответствии с указаниями в нормативной документации в соответствии с ОФС «Иммуноэлектрофорез в агаровом геле». В результате анализа должны выявляться линии преципитации только с сывороткой против белков сыворотки крови человека. Допустимо проведение испытания методом иммунодиффузии в геле в соответствии с ОФС «Иммунодиффузия в геле».

2. ***Специфичность антител.*** Должен содержать антитела к ортопоксвирусам. Определение проводят в реакции нейтрализации, в соответствии с разделом «Специфическая активность».

Извлекаемый объем. Извлекаемый объём должен быть не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объём лекарственных форм для парентерального применения» .

Цветность. Бесцветный или светло-желтый раствор. Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

Допустимо спектрофотометрическое определение оптической плотности раствора. Методику определения указывают в нормативной документации.

Прозрачность. Прозрачный или слегка опалесцирующий раствор (если нет других указаний в нормативной документации). Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачности и степень мутности жидкостей».

Допустимо спектрофотометрическое определение оптической плотности испытуемого раствора иммуноглобулина. Методику определения указывают в нормативной документации.

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в

лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH. От 6,6 до 7,4. Испытуемый образец разводят до 1 % концентрации 0,9 % раствором натрия хлорида. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Белок. От 9 до 11 %. Определение проводят колориметрическим методом с биуретовым реактивом в соответствии с ОФС «Количественное определение белка колориметрическим методом с биуретовым реактивом в препаратах крови человека и животных».

Электрофоретическая однородность. Фракция иммуноглобулинов должна составлять не менее 95 % от общего белка. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Определение однородности лекарственных препаратов из сыворотки крови человека и животных методом электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы».

Молекулярные параметры. Содержание мономеров и димеров иммуноглобулина G должно быть не менее 85 %, полимеров и агрегатов – не более 10 %. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Определение молекулярных параметров иммуноглобулинов методом ВЭЖХ», если нет других указаний в нормативной документации.

Фракционный состав. Должна выявляться интенсивная линия преципитации IgG и не более 4 дополнительных линий. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Иммуноэлектрофорез в агаровом геле» с использованием сыворотки для иммуноэлектрофореза против белков сыворотки крови человека.

Термостабильность. Препарат должен оставаться жидким и не образовывать геля после выдерживания в водяной бане или водяном термостате при температуре (56 ± 1) °С в течение 4 ч. Определение проводят визуально.

Стерильность. Должен быть стерильным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность. Должен быть апирогенным**.** Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Объем вводимого препарата не должен превышать 1,5 мл на 1 кг массы кролика.

Аномальная токсичность. Должен быть нетоксичным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

Препарат вводят внутрибрюшинно 5 белым мышам массой 17 – 20 г по 0,5 мл и 2 морским свинкам массой 250 – 300 г – по 5 мл (по 2,5 мл в каждый бок) подкожно. Наблюдение за животными проводят в течение 7 сут.

Специфическая активность. Содержание антител к ортопоксвирусам должно быть не менее 1:4000. Определение проводят в реакции нейтрализации путем введения смеси разведений иммуноглобулина с рабочим разведением вирусного материала на хорионаллантоисные оболочки (ХАО) 12-дневных куриных эмбрионов.

Методика испытания

Подготовка куриных эмбрионов. Проводят овоскопию куриных эмбрионов в затемненном помещении. Каждый эмбрион просматривают в направленном пучке света. Свет должен падать сверху на тупой конец яйца. Яйцо с погибшим эмбрионом или с кровоизлиянием под оболочкой бракуют. В центре воздушного мешка на тупом конце яйца и на боковой поверхности яйца, на участке между сосудами и их ответвлениями карандашом делают отметку. В местах отметок с соблюдением правил асептики пропиливают бормашиной с абразивным диском отверстия (щели) длиной 3 – 4 мм и шириной 1,5 мм, не повреждая оболочки. Яйцо укладывают так, чтобы отверстие на боковой стороне было обращено вверх. Подскорлупную оболочку в центре воздушного мешка прорывают плоской полукруглой хирургической иглой. Затем на отверстие, расположенное на боковой поверхности, вносят 0,1 мл 0,004 М стерильного фосфатно-цитратного буферного (ФЦБ) раствора Мак-Илвейна, подогретого до температуры (50 ± 5) °С, и той же иглой осторожно продавливают подскорлупную оболочку. После этого практически вся капля раствора проходит под подскорлупную оболочку и частично отслаивает ХАО.

Из отверстия в центре воздушного мешка резиновой грушей осторожно отсасывают воздух до полного опускания ХАО и создания искусственного воздушного мешка под боковой щелью. Для контроля наличия и величины искусственного воздушного мешка вновь проводят овоскопию и бракуют эмбрионы, имеющие кровоизлияния, воздушные мешки под ХАО или без искусственных воздушных мешков. Яйца с опущенной ХАО помещают на лотки отверстием вверх и выдерживают 2 ч в термостате при температуре (37 ± 1) °С. Затем проводят овоскопию повторно и бракуют эмбрионы с воздушными мешками под ХАО, без искусственных воздушных мешков и имеющие кровоизлияния.

Определение рабочего разведения вируса. Для постановки реакции нейтрализации используют подготовленные куриные эмбрионы, стандартный образец активности, специфичности и некротической активности оспенной вакцины в качестве вируса и испытуемый иммуноглобулин.

Определяют рабочее разведение вируса титрованием на ХАО 12-дневных куриных эмбрионов. Для этого готовят ряд последовательных десятикратных разведений вируса на ФЦБ. По 6 куриных эмбрионов заражают каждым разведением вируса, нанося на ХАО по 0,1 мл. Инкубируют в термостате 48 ч при температуре (37 ± 1) °С, затем проводят учет результатов. Эмбрионы вскрывают, подсчитывают количество развившихся на ХАО оспин и рассчитывают среднее арифметическое для каждого разведения. Для нейтрализации используют то разведение вируса, которое дает на ХАО от 40 до 80 оспин, если нет других указаний в нормативной документации.

Постановка реакции нейтрализации. Готовят разведения иммуноглобулина человека противооспенного на ФЦБ: 1:1000; 1:2000; 1:3000; 1:4000 (если нет других указаний в нормативной документации) и контрольного отрицательного образца донорской сыворотки от 1:250 до 1:500 в объеме 0,5 – 1 мл. Смешивают равные объемы каждого разведения иммуноглобулина или контрольного отрицательного образца донорской сыворотки и рабочего разведения вируссодержащей жидкости. После смешивания разведения удваи-

ваются и становятся равными соответственно для проб иммуноглобулина: 1:2000; 1:4000; 1:6000; 1:8000; для контрольного отрицательного образца донорской сыворотки – 1:500; 1:1000. Смеси выдерживают при температуре (37 ± 1) °С в течение 2 ч. После инкубации наносят по 0,1 мл каждого разведения смеси на ХАО куриных эмбрионов, используя для каждого разведения по 5 – 6 эмбрионов. Инкубируют в термостате 48 ч при температуре (37 ± 1) °С. Эмбрионы вскрывают, рассчитывают среднее арифметическое количество оспин для каждого разведения иммуноглобулина и контрольного образца.

Чувствительность куриных эмбрионов к вирусу осповакцины определяют в каждом испытании по показателю «Специфическая активность» стандартного образца активности, специфичности и некротической активности оспенной вакцины на ХАО куриных эмбрионов согласно инструкции по его применению.

Учет результатов. В исследовании должны быть подтверждены установленный показатель специфической активности стандартного образца активности, специфичности и некротической активности оспенной вакцины. Титром испытуемого препарата иммуноглобулина человека противооспенного считают его конечное разведение, дающее нейтрализацию не менее 50 % оспин от числа оспин, образуемых вирусом осповакцины в сочетании с контрольным отрицательным образцом донорской сыворотки.

Примечания

1. Приготовление ФЦБ раствора Мак-Илвейна 0,004 М, pH (7,2 – 7,4). Готовят растворы 1 и 2.

Раствор 1: Растворяют 2,1 г лимонной кислоты в 100 мл воды очищенной.

Раствор 2: В мерной колбе вместимостью 1000 мл в 500 мл воды очищенной растворяют 28,4 натрия гидрофосфата безводного или 35,6 г натрия гидрофосфата дигидрата или 71,6 г натрия гидрофосфата додекагидрата, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Смешивают 2 мл раствора 1 и 18 мл раствора 2 в мерной колбе вместимостью 1000 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Полученный раствор должен иметь pH 7,2 – 7,4. Если pH полученного раствора более 7,4, его доводят до нормы раствором 1. В случае, ес-

ли pH полученного раствора меньше 7,2, приготовление раствора повторяют. Буферный раствор стерилизуют при температуре (120 ± 1) °С и давлении (0,1 ± 0,01) МПа в течение 8 – 30 мин (в зависимости от объема) или фильтруют через мембраны с диаметром пор 0,22 мкм и хранят при температуре от 2 до 8 °С. Срок хранения от 10 до 30 сут в зависимости от способа укупорки флаконов (способ укупорки флаконов должен быть указан в нормативной документации).

Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg). Препарат не должен содержать поверхностного антигена вируса гепатита В. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения Российской Федерации, в соответствии с инструкциями по применению. Чувствительность тест-системы для определения поверхностного антиген вируса гепатита В (HBsAg) должна быть не ниже 0,1МЕ/мл.

Антитела к вирусу гепатита С. Антитела к вирусу гепатита С должны отсутствовать. Определение проводят в соответствии с инструкциями по применению иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения Российской Федерации и имеющих 100 % чувствительность и специфичность.

Антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Препарат не должен содержать антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1, ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Определение проводят в соответствии с инструкциями по применению иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения Российской Федерации и имеющих 100 % чувствительность и специфичность.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные препараты из плазмы крови человека»».

На вторичную (потребительскую) упаковку лекарственных средств должна наноситься надпись: «Антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, к вирусу гепатита С и поверхностный антиген вируса гепатита В отсутствуют».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.

Интерферон человеческий лейкоцитарный	ФС.3.3.1.0040.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на интерферон человеческий лейкоцитарный, представляющий собой группу белков (интерфероны альфа-типа), синтезируемых лейкоцитами, которые получены из крови клинически здоровых доноров в ответ на воздействие вируса – индуктора интерферона (вирус болезни Ньюкасла или вирус Сендай).

Основными характеристиками интерферона человеческого лейкоцитарного являются:

- универсальность (активен против большинства ДНК- и РНК-содержащих вирусов);

- выраженная видоспецифичность;

- последействие (после удаления вируса в обработанных клетках сохраняется способность подавлять размножение вируса);

- нечувствительность к антителам против вирусов, индуцирующих их образование.

ПРОИЗВОДСТВО

Характеристика производственных штаммов

Для производства интерферона лейкоцитарного человеческого в качестве интерфероногена используют вирус болезни Ньюкасла (NDV) или вирус парагриппа Сендай, депонированные в национальной или международной коллекции.

Вирус болезни Ньюкасла не должен быть контаминирован бактериями (в том числе микоплазмами) и посторонними вирусами. Инфекционная активность NDV должна быть не менее 10^8 $ТЦД_{50}$/мл, титр гемагглютининов – не менее 1:128 ГАЕ/мл при использовании штамма «Н» вируса болезни Ньюкасла и не менее 1:256 ГАЕ/мл при использовании ts-мутанта штамма «Н» вируса болезни Ньюкасла.

Вирус болезни Ньюкасла должен оказывать цитопатическое действие на 3-суточную культуру куриных фибробластов; репродуцироваться в 9 –11-суточных куриных эмбрионах при температуре (37 ± 1) ^{0} С; для ts-мутанта штамма «Н» вируса болезни Ньюкасла – при температуре (32 ± 1) ^{0} С в течение 48 ч.

Вирус Сендай не должен быть контаминирован бактериями (в том числе микоплазмами) и посторонними вирусами; титр гемагглютининов должен быть не менее 1:16000 ГАЕ/мл при отсутствии цитопатического действия; должен репродуцироваться в 10 – 11 суточных куриных эмбрионах при температуре (37 ± 1) ^{0} С в течение 72 ч.

Требования к донорской крови определяются в соответствии с национальными требованиями, включая**:**

- стерильность, хранение при температуре от 2 до 8 ^{0}С не более 48 ч с момента забора;

- количество жизнеспособных лейкоцитов при подсчете должно быть не менее 70 %.

Требования к куриным эмбрионам определяются в соответствии с национальными требованиями, включая**:**

- эмбрионы должны быть получены от здоровых кур из благополучных в эпизоотическом отношении птицеводческих хозяйств, при отсутствии заболеваемости кур туберкулезом, оспой и другими инфекциями птиц; возраст эмбрионов при использовании вируса болезни Ньюкасла – 9 – 11 сут; при использовании вируса Сендай – 10 – 11 сут; сеть кровеносных сосудов при овоскопии должна быть хорошо развита;

- хранение и транспортировка оплодотворенного яйца до инкубации осуществляется согласно ОСТ Стандарт отрасли "Яйца инкубационные. Технические условия";

- аллантоисная вируссодержащая жидкость и главный посевной материал (лиофилизированная аллантоисная вируссодержащая жидкость) не должны быть контаминированы бактериями (в том числе микоплазмами). Инфекционная активность должна быть не менее 10^8 $ТЦД_{50}$/мл.

Питательные среды

Производственные питательные среды не должны содержать компонентов, вызывающих аллергические или иные нежелательные реакции у человека. Сырье, реактивы и реагенты, используемые при производстве питательных сред, должны быть подтверждены сертификатами (паспортами) качества. Питательные среды должны быть стерильными.

Основные стадии производства и контроля интерферона:

- получение вируса-индуктора (контрольные параметры (КП) – стерильность; гемагглютинирующая активность вируса);

- получение «чистых» лейкоцитов (КП – стерильность; отсутствие поверхностного антигена вируса гепатита В; отсутствие антител к вирусу гепатита С, вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1, ВИЧ-2) и возбудителю сифилиса; отсутствие нуклеиновых кислот вирусов гепатита В и С, ВИЧ и других вирусов в соответствии с национальными требованиями; количество жизнеспособных лейкоцитов; объем загрузки в реактор или общий объем в бутылях при роллерном культивировании лейкоцитов);

- индукция интерфероногенеза и биосинтез интерферона (КП – гемагглютинирующая активность вируса-индуктора; температура в реакторе или в термокомнате; время прохождения стадии; скорость вращения центрифуги; pH);

- очистка полуфабриката интерферона (КП – температура и давление внутри емкости с полуфабрикатом при культивировании в реакторе; стерильность; специфическая активность; специфическая безопасность; pH);

- розлив (КП – номинальный объем; визуальный осмотр; стерильность);

- сублимационное высушивание – для лиофилизированных форм (КП – температура полок и время замораживания);

- контроль препарата в первичной упаковке;

- упаковка, маркировка (КП – соответствие упаковки и маркировки).

Перечень показателей качества различных лекарственных форм препаратов интерферона и требования к ним приводятся в нормативной документации.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Приводят описание физических свойств соответствующей лекарственной формы лекарственного средства.

Подлинность. Должен представлять собой интерферон альфа-типа. Определение проводят в соответствии с ОФС «Биологические методы испытания препаратов интерферона с использованием клеточных культур».

Специфическая активность. Значение показателя должно соответствовать требованиям нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Биологические методы испытания препаратов интерферона с использованием культур клеток».

Овальбумин. Содержание овальбумина должно быть не более 0,05 мкг/мл. Определение проводят методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием тест-систем в соответствии с ОФС «Метод иммуноферментного анализа».

Время растворения (для лиофилизированных форм). Не более 3 мин, если нет других указаний в нормативной документации. В ампулу вносят 2 мл растворителя, предусмотренного требованиями нормативной документации. Наблюдают визуально процесс растворения, время полного растворения определяют с помощью секундомера.

Извлекаемый объем (для жидких форм). Не менее номинального. Определяют в соответствии с ОФС «Извлекаемый объём лекарственных форм для парентерального применения».

Прозрачность. Должен выдерживать сравнение с эталоном II. Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Цветность. Должен соответствовать требованиям нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

Механические включения (для инъекционных форм). Должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах» и ОФС «Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения».

pH. Допустимый интервал значений должен соответствовать требованиям нормативной документации. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия». При определении pH после растворения следует указать растворитель и его объем.

Потеря в массе при высушивании (для лиофилизированных форм). Не должна превышать 3,5 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Белок. Содержание белка должно соответствовать требованиям нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение белка» методом с биуретовым реактивом или в соответствии с ОФС «Определение белка колориметрическим методом (метод Лоури) в биологических лекарственных препаратах» (метод А без предварительного осаждения белка).

Стерильность. Препарат должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Микоплазмы. Должны отсутствовать. Определение проводят в соответствии с ОФС «Испытание на присутствие микоплазм».

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичным. Определение проводят по ОФС «Аномальная токсичность».

Токсичность. Препарат не должен оказывать токсического действия на культуру клеток.

Для определения токсичности препарата используют однослойные перевиваемые или диплоидные клеточные культуры, чувствительные к данному типу интерферона и применяемые для определения его специфической активности. Клетки выращивают способом, предусмотренным для данного вида (так же, как и для определения специфической активности). В лунки с 1 – 3-суточным монослоем вносят по 0,1 мл препарата интерферона в разведении, указанном в нормативной документации для каждого конкретного препарата. В лунки с контрольной культурой вносят поддерживающую среду без препарата интерферона. Культуры выдерживают в течение 24 – 48 ч при температуре (37 ± 1) ^{0}С в атмосфере с (5,0 ± 0,5) % CO_2, после чего просматривают под микроскопом. Клеточный монослой должен оставаться неповрежденным, без признаков дегенерации и не отличаться от контрольных проб.

Специфическая безопасность. Препарат не должен содержать живого вируса – индуктора интерферона. Испытание на полноту инактивации вируса-индуктора проводят одним из 2 методов: с использованием 9 – 11-суточных куриных эмбрионов или культуры клеток куриных фибробластов.

1. Испытание на куриных эмбрионах. Испытуемый препарат вводят по 0,2 мл в аллантоисную полость 9 – 11 суточных эмбрионов (не менее 5). Инкубируют при температуре (37 ± 1) ^{0}С в течение 48 ч (при использовании в качестве индуктора интерферона вируса болезни Ньюкасла) или в течение 72 ч (при использовании вируса Сендай). После инкубации эмбрионы должны оставаться жизнеспособными. Отдельно из каждого эмбриона отсасывают аллантоисную жидкость и проверяют ее в реакции гемагглютинации. Для этого в лунки планшетов для серологических реакций вносят по 0,5 мл аллантоисной жидкости. Затем в каждую лунку добавляют равный объем 0,5 % суспензии куриных эритроцитов в 0,9 % растворе натрия хлорида или в буферном растворе. Результаты учитывают визуально через 20 – 30 мин после оседания эритроцитов. Гемагглютинация во всех проверяемых образцах

должна отсутствовать. При гибели хотя бы 1 эмбриона или наличии гемагглютинации хотя бы в 1 пробе испытание повторяют на удвоенном количестве эмбрионов. В случае повторной гибели эмбрионов или выявлении гемагглютинации препарат считают не прошедшим испытание.

2. Испытание на фибробластах куриных эмбрионов. Испытание на фибробластах куриных эмбрионов проводят в однослойной культуре клеток, выращенной в лунках 96-луночного плоскодонного планшета на питательной среде 199 или Игла-МЕМ, содержащей 5 – 10 % сыворотки крови крупного рогатого скота, 100 ед/мл бензилпенициллина натриевой соли и 100 мкг/мл гентамицина сульфата или канамицина сульфата. Посевная доза – не менее 5 · 10^4 кл/0,1 мл на лунку. Планшеты с культурой клеток инкубируют 3 – 4 сут при температуре (37 ± 1) ^{0}С в атмосфере 5 % CO_2 при влажности (70 ± 5) %. Среду сливают и в лунки планшетов вносят по 0,1 мл испытуемого препарата интерферона в разведении 1:5 в питательной среде 199 или Игла-МЕМ. На каждый образец препарата используют не менее 4 лунок. В такое же количество лунок с контрольной культурой клеток вносят питательную среду без препарата. Учет проводят под микроскопом при 100-кратном увеличении через 48 – 72 ч инкубации. Монослой клеток должен оставаться неповрежденным, цитопатическое действие должно отсутствовать. При наличии дегенерации культуры клеток испытание повторяют. При повторном выявлении цитопатического действия испытуемого препарата и в отсутствие цитопатического эффекта в контрольных лунках препарат считают не прошедшим испытание.

Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg). Препарат не должен содержать поверхностного антигена вируса гепатита В. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения Российской Федерации и имеющих чувствительность не ниже 0,1 нг/мл.

Антитела к вирусу гепатита С. Антитела к вирусу гепатита С должны отсутствовать. Определение проводят иммуноферментным методом с ис-

пользованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения Российской Федерации и имеющих 100 % чувствительность и специфичность, в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2). Препарат не должен содержать антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2). Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения Российской Федерации и имеющих чувствительность и специфичность не ниже 100 %.

Маркировка и упаковка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты**».**

На вторичную (потребительскую) упаковку лекарственных средств должна наноситься надпись: «Антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, к вирусу гепатита С и поверхностный антиген вируса гепатита В отсутствуют».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 ^{0}С. Не замораживать.

Сыворотка противогангренозная поливалентная лошадиная ФС.3.3.1.0041.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на сыворотку противогангренозную поливалентную лошадиную, представляющую собой иммуноглобулиновую фракцию сыворотки крови лошадей, содержащую специфические антитела, нейтрализующие токсины возбудителей газовой гангрены рода *Clostridium* (*C. perfringens* типа А, *C. novyi* и *C. septicum*).

Сыворотка противогангренозная поливалентная лошадиная предназначена для экстренной профилактики и лечения газовой гангрены.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство сыворотки противогангренозной поливалентной лошадиной должно быть валидировано с целью подтверждения установленных требований, гарантирующих ее качество и безопасность применения.

Сыворотку получают из плазмы лошадей, гипериммунизированных гангренозными токсинами/анатоксинами. Для получения очищенной концентрированной иммуноглобулиновой фракции плазмы лошади, содержащей антитела (антитоксины), нейтрализующие гангренозные экзотоксины, применяют методы солевого фракционирования, ферментолиза и мембранной фильтрации.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость с желтоватым оттенком, без осадка. Определение проводят визуально.

Подлинность. Должна нейтрализовать действие токсинов, продуцируемых *C. perfringens* типа А, *C. novyi* и *C. septicum*. Определение проводят, как описано в разделе «Специфическая активность».

Прозрачность. Показатель оптической плотности не должен превышать 0,05. Определение проводят фотометрическим методом при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 3 мм против контрольного раствора – воды очищенной, если нет других указаний в нормативной документации.

Цветность. Показатель оптической плотности не должен превышать 0,15. Определение проводят фотометрическим методом при длине волны 400 нм в кювете с толщиной слоя 3 мм против контрольного раствора – воды очищенной, если нет других указаний в нормативной документации.

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH. От 6,8 до 7,2. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Белок. От 8 до 14 %. Определение проводят колориметрическим методом с биуретовым реактивом в соответствии с ОФС «Количественное определение белка колориметрическим методом с биуретовым реактивом в препаратах крови человека и животных» Метод А.

Стерильность. Должна быть стерильной. Испытания проводят методами прямого посева или мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность. Должна быть апирогенной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность», если не указано иначе в нормативной документации производителя. Указывают допустимые пределы изменения температуры тела животных и тест-дозу. Если не указано иначе, вводят внутривенно 1 мл неразведенной сыворотки на 1 кг массы кролика.

Аномальная токсичность. Должна быть нетоксичной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

Специфическая активность. Не менее 700 международных единиц (МЕ) каждого типа гангренозных антитоксинов в 1 мл. Специфическую активность сыворотки по каждому типу гангренозных антитоксинов определяют в тесте нейтрализации соответствующих токсинов.

Определение опытных доз гангренозных токсинов. Опытная доза токсина (L+/) представляет собой наименьшее количество токсина, которое в смеси с определенным количеством соответствующего антитоксина при внутривенном введении белым мышам вызывает гибель не менее 50 % животных.

Опытную дозу токсина *C. perfringens* ($L+_{/10}$) определяют по отношению к 0,1 МЕ антитоксина *C. perfringens*, токсина *C. septicum* ($L+_{/5}$) – по отношению к 0,2 МЕ антитоксина *C. septicum*, токсина *C. novyi* ($L+_{/50}$) – по отношению к 0,02 МЕ антитоксина *C. novyi*.

Для определения опытных доз для каждого из гангренозных токсинов готовят не менее 4 последовательных разведений, отличающихся между собой по содержанию токсина на 10 – 20 %. К 0,1 МЕ референс-препарата (или стандартного образца активности) антитоксина *C. perfringens*, или 0,2 МЕ референс-препарата (или стандартного образца активности) антитоксина *C. septicum*, или 0,02 МЕ референс-препарата (или стандартного образца активности) антитоксина *C. novyi*, взятых в объеме 0,2 мл, добавляют подготовленные разведения токсинов в объеме 0,3 мл. Смеси готовят из расчета на 5 мышей (1 мл стандартного образца активности антитоксина и 1,5 мл токсина).

Полученные смеси перемешивают и выдерживают при температуре от 18 до 22 °С в течение (45 ± 1) мин, затем каждую вводят по 0,5 мл внутривенно 4 белым мышам.

При определении опытной дозы токсинов *C. perfringens* и *C. septicum* наблюдают за животными в течение 48 ч, а при определении опытной дозы

токсина *C. novyi* – в течение 96 ч, отмечая количество выживших мышей в каждой группе.

Определение специфической активности (титра) сыворотки противогангренозной C. perfringens. Готовят ряд разведений испытуемой поливалентной противогангренозной сыворотки в 0,9 % растворе натрия хлорида с таким расчетом, чтобы, в зависимости от предполагаемого титра, 0,1 МЕ содержалось в 0,2 мл раствора. К 1 мл каждого разведения сыворотки добавляют 1,5 мл токсина *C. perfringens*, содержащего в объеме 0,3 мл опытную дозу. Определение проводят с 6 – 8 разведениями сыворотки (например, 1:1300; 1:1400; 1:1500 и т.д.), отличающимися по своей предполагаемой активности одно от другого на 10 – 20 %.

Каждый опыт титрования (приготовления разведений испытуемой сыворотки) сопровождают контролем опытной дозы токсина, вводимой в смеси с 0,1 МЕ стандартного образца активности антитоксина *C. perfringens*. После выдерживания при температуре от 18 до 22 °С в течение (45 ± 1) мин смесь из каждой пробирки вводят 4 белым мышам внутривенно в объеме 0,5 мл. За животными наблюдают в течение 48 ч. К концу наблюдения в контроле должно погибнуть не менее 50 % взятых в опыт мышей. Максимальное разведение сыворотки, предохраняющее от гибели 100 % мышей в данной группе, содержит 0,1 МЕ в 0,2 мл, т.е. 0,5 МЕ в 1 мл.

Титр антитоксина *C. perfringens* в испытуемой сыворотке рассчитывают, исходя из взятых в опыт разведений. Например, если максимальное разведение сыворотки, защищающее от гибели 100 % мышей, соответствует 1:1300, то 1 мл этого разведения содержит 0,5 МЕ антитоксина *C. perfringens*, следовательно, 1 мл испытуемой сыворотки содержит 0,5 МЕ 1300 = 650 МЕ антитоксина *C. perfringens*.

Определение титра антитоксина C. septicum. Готовят ряд разведений испытуемой поливалентной противогангренозной сыворотки в 0,9 % растворе натрия хлорида с таким расчетом, чтобы, в зависимости от предполагаемого титра, в 0,2 мл разведенной сыворотки содержалось 0,2 МЕ. К 1 мл

каждого разведения сыворотки добавляют 1,5 мл токсина *C. septicum*, содержащего в объеме 0,3 мл опытную дозу. Определение проводят с 6 – 8 разведениями сыворотки (например, 1:650; 1:700; 1:750 и т.д.), отличающимися по своей предполагаемой активности одно от другого на 10 – 20 %.

Каждый опыт титрования испытуемой сыворотки сопровождают контролем опытной дозы токсина, вводимой в смеси с 0,2 МЕ стандартного образца активности антитоксина *C. septicum*. После выдерживания при температуре от 18 до 22 °С в течение (45 ± 1) мин смесь токсина с каждым разведением сыворотки вводят 4 белым мышам внутривенно в объеме 0,5 мл. За животными наблюдают в течение 48 ч. К концу наблюдения в контроле должно погибнуть не менее 50 % взятых в опыт мышей. Максимальное разведение сыворотки, предохраняющее от гибели 100 % мышей в группе, содержит 0,2 МЕ в 0,2 мл, т.е. 1 МЕ в 1 мл. Титр антитоксина *C. septicum* в испытуемой сыворотке рассчитывают, исходя из взятых в опыт разведений. Например, если максимальное разведение сыворотки, защищающее от гибели 100 % мышей, соответствует 1:700, то 1 мл этого разведения содержит 1 МЕ, следовательно, 1 мл неразведенной сыворотки содержит 1 МЕ 700 = 700 МЕ антитоксина *C. septicum*.

Определение титра антитоксина C. novyi. Готовят ряд разведений испытуемой поливалентной противогангренозной сыворотки в 0,9 % растворе натрия хлорида с таким расчетом, чтобы, в зависимости от предполагаемого титра, 0,02 МЕ содержались в 0,2 мл раствора. К 1 мл каждого разведения сыворотки добавляют 1,5 мл токсина, содержащего в объеме 0,3 мл опытную дозу. Определение проводят с 6 – 8 разведениями сыворотки (например, 1:6500; 1:7000; 1:7500 и т.д.), отличающимися по предполагаемой активности одно от другого на 10 – 20 %. Каждый опыт титрования сопровождают контролем опытной дозы токсина, вводимой в смеси с 0,02 МЕ стандартного образца активности антитоксина *C. novyi*. После инкубирования при температуре от 18 до 22 °С в течение (45 ± 1) мин каждую смесь вводят 4 белым мышам внутривенно в объеме 0,5 мл. За животными наблюдают в течение 96 ч.

К концу наблюдения в контроле должно погибнуть не менее 50 % взятых в опыт мышей.

Максимальное разведение сыворотки, предохраняющее от гибели 100 % взятых в опыт белых мышей, содержит 0,02 МЕ в 0,2 мл, т.е. 0,1 МЕ в 1 мл. Титр антитоксина *C. novyi* в испытуемой сыворотке рассчитывают, исходя из взятых в опыт разведений. Например, если максимальное разведение сыворотки, защищающее от гибели 100 % мышей, соответствует 1:8000, то в 1 мл этого разведения содержится 0,1 МЕ антитоксина *C. novyi.* Следовательно, 1 мл неразведенной сыворотки содержит 0,1 МЕ 8000 = 800 МЕ антитоксина *C. novyi*.

Активность каждого компонента поливалентной сыворотки рассчитывают, исходя из разведения с наименьшей концентрацией сыворотки, которое в смеси с опытной дозой токсина обеспечивает 100 % выживаемость взятых в опыт животных.

Специфическую активность (титр) поливалентной сыворотки выражают по компоненту с наименьшей активностью. В данном примере – по антитоксину *C. perfringens*.

Удельная активность. Не менее 500 МЕ на 0,1 г белка каждого типа антитоксина *C. perfringens*, *C. novyi*, *C. septicum*.

Удельную активность (*X*) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{T}{C \cdot 10},$$

где: *T* – титр сыворотки, МЕ/мл;

C – концентрация белка, г/мл;

10 – постоянный коэффициент

Сульфат-ионы. Не более 0,025 %. Определение проводят колориметрическим методом. К 5 мл испытуемого образца и 5 мл рабочего эталонного раствора прибавляют по 0,5 мл 5 % раствора бария хлорида и перемешивают. Через 15 мин пробы перемешивают и измеряют оптическую плотность суспензий при длине волны 540 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм против

контрольного раствора, содержащего 5 мл образца и 0,5 мл воды очищенной, для эталонного раствора – вода очищенная (5 мл).

Испытание проводят в 2 повторностях. Для расчета используется среднее значение.

Расчет содержания сульфат-ионов (X) в процентах производят по формуле:

$$X = \frac{0{,}002 \cdot A_{\text{опыт}}}{A_{\text{эталон}}},$$

где: $A_{\text{опыт}}$ – значение оптической плотности испытуемого образца;
$A_{\text{эталон}}$ – значение оптической плотности рабочего эталонного раствора;
0,002 –концентрация эталонного раствора калия сульфата (сульфат-ионы, %)

Примечания

1. Приготовление основного раствора калия сульфата (1 мг/мл сульфат-ионов). В мерной колбе вместимостью 1000 мл в воде очищенной растворяют 1,8140 г калия сульфата, высушенного до постоянной массы при температуре 100 – 105 °С, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 1 года.
2. Приготовление рабочего эталонного раствора калия сульфата (0,002 % сульфат-ионов). В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1 мл основного раствора калия сульфата, доводят водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Натрия хлорид. От 0,85 до 0,95 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение хлоридов методом обратного осадительного титрования в биологических лекарственных препаратах».

Хлороформ. Не более 0,1 %. Определение проводят колориметрическим методом, основанным на способности хлороформа образовывать с резорцином в щелочной среде соединение хиноидной структуры, которое дает цветную реакцию.

В пробирки вносят по 0,1 мл испытуемого образца и образца сравнения (0,1 % раствор хлороформа), добавляют 0,9 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, 2 мл 20 % раствора натрия гидроксида, 1 мл 10 % раствора резорцина и перемешивают. Содержимое пробирок перемешивают и нагревают на кипя-

щей водяной бане в течение 1 мин. Пробы осторожно охлаждают до температуры 15 – 18 ^{0}С, затем измеряют оптическую плотность окрашенного раствора при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 5 мм по сравнению с контрольным раствором, состоящим из 1 мл воды очищенной, 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и 2 мл 20 % раствора натрия гидроксида. Раствор резорцина в контрольный раствор не добавляют, т.к. продукты его окисления окрашиваются в зеленый цвет.

Расчет содержания хлороформа проводят путем сравнения оптической плотности испытуемого образца и образца сравнения (0,1 % раствор хлороформа).

Содержание хлороформа (X) в процентах в испытуемом образце вычисляют по формуле:

$$X = \frac{0{,}1 \cdot A\,\text{исп}}{A\,\text{ст}},$$

где : $A_{\text{исп}}$ – значение оптической плотности испытуемого образца;
$A_{\text{ст}}$ – значение оптической плотности образца сравнения – 0,1 % раствора хлороформа.
0,1 – концентрация раствора хлороформа, %

Примечания

1. Приготовление 0,1 % раствора хлороформа. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,1 мл хлороформа, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор используют через 24 ч.
2. Приготовление 10 % раствора резорцина. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 5 г резорцина, растворяют в 30 мл воды очищенной, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объём лекарственных форм для парентерального применения».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 ºС. Замораживание не допускается.

Сыворотки противоботулинические типов А, В, Е лошадиные ФС.3.3.1.0042.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на сыворотки противоботулинические типов А, В и Е, представляющие собой иммуноглобулиновые фракции сыворотки крови лошадей, содержащие специфические антитела, нейтрализующие ботулинические токсины типов А, В или Е. Сыворотки предназначены для экстренной профилактики и лечения ботулизма.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство сывороток противоботулинических типов А, В и Е должно быть валидировано с целью подтверждения установленных требований и гарантирующее качество и безопасность их применения.

Сыворотки получают из плазмы крови лошадей, гипериммунизированных соответствующими ботулиническими анатоксинами/токсинами. Полученную иммуноглобулиновую фракцию плазмы крови лошади, содержащую антитела (антитоксины), нейтрализующие ботулинический токсин соответствующего типа, очищают и концентрируют методами солевого фракционирования, ферментолиза и мембранной фильтрации.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость с желтоватым оттенком, без осадка. Определение проводят визуально.

Подлинность. Сыворотка должна нейтрализовывать действие ботулинических токсинов типов А, В и/или Е. Определение проводят, как описано в разделе «Специфическая активность».

Прозрачность. Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость. Показатель оптической плотности не должен превышать 0,05. Определение проводят фотометрическим методом при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 3 мм, если нет других указаний в нормативной документации.

Цветность. Жидкость с желтоватым оттенком. Показатель оптической плотности не должен превышать 0,15. Определение проводят фотометрическим методом при длине волны 400 нм в кювете с толщиной слоя 3 мм, если нет других указаний в нормативной документации.

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH. От 6,8 до 7,2. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Содержание белка. От 8 до 12 %. Определение проводят колориметрическим методом с биуретовым реактивом в соответствии с ОФС «Количественное определение белка колориметрическим методом с биуретовым реактивом в препаратах крови человека и животных». Метод А.

Стерильность. Должна быть стерильной. Испытания проводят методами прямого посева или мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность. Должна быть апирогенной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Указывают допустимые пределы изменений температуры тела у животных и тест-дозу. Вводят 1 мл неразведенной сыворотки на 1 кг массы кролика.

Аномальная токсичность. Должна быть нетоксичной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность», если нет других указаний в нормативной документации.

Специфическая активность. Не менее 2500 международных единиц (МЕ) в 1 мл – для противоботулинической сыворотки типа А, не менее 600 МЕ/мл – для противоботулинической сыворотки типа В и не менее 1200 МЕ/мл – для противоботулинической сыворотки типа Е. Специфическую активность противоботулинических сывороток каждого серотипа в отдельности определяют в тесте нейтрализации соответствующих токсинов (1 МЕ ботулинического антитоксина – это специфически нейтрализующая активность антитоксической сыворотки в отношении ботулинического токсина одноименного типа, которая содержится в определенном количестве международного стандартного образца, представляющего собой противоботулиническую лиофилизированную лошадиную сыворотку определенного серотипа).

Определение опытной дозы ботулинических токсинов. Опытная доза (L+/5) ботулинических токсинов типа А, В и Е представляет собой наименьшее количество токсина, которое в смеси с 0,2 МЕ антитоксической противоботулинической сыворотки одноименного типа при введении мышам вызывает гибель 50 % животных (при явлениях ботулизма) на 4 сут.

Для определения опытной дозы готовят несколько разведений ботулинического токсина, различающихся между собой на 10 – 20 %.

При определении L+/5 токсина используют стандартный образец (СО) активности противоботулинической сыворотки соответствующего типа, калиброванный в МЕ, который разводят 0,9 % раствором натрия хлорида с таким расчетом, чтобы в 1 мл раствора содержалась 1 МЕ (0,2 МЕ в 0,2 мл). Смешивают 1 мл СО активности противоботулинической сыворотки с 1,5 мл раствора ботулинического токсина одноименного типа разной концентрации, начиная с наименьшей. Смеси токсина с сывороткой осторожно перемешивают, выдерживают при температуре от 18 до 22 ºС. в течение (45 ± 1) мин, затем вводят по 0,5 мл внутривенно 4 белым мышам массой 16 – 18 г. За жи-

вотными наблюдают 4 сут, отмечая у них появление симптомов ботулизма. Определяют то разведение токсина, которое в смеси со стандартным образцом соответствующего антитоксина вызвало гибель 50 % животных при явлениях ботулизма.

Определение специфической активности (титра) противоботулинической сыворотки. Исходя из предполагаемой активности, сыворотку разводят 0,9 % раствором натрия хлорида до концентрации 1 МЕ/мл. Готовят несколько последовательных разведений сыворотки, отличающихся по активности одно от другого на 10 – 20 %.

По 1 мл каждого разведения сыворотки переносят во флаконы, добавляют по 1,5 мл ботулинического токсина одноименного типа, содержащего 5 опытных доз. Полученные смеси осторожно перемешивают, избегая пенообразования и после выдерживания при температуре от 18 до 22 ºС в течение (45 ± 1) мин вводят 4 белым мышам массой 16 – 18 г внутривенно в объеме 0,5 мл. За животными наблюдают 4 сут, отмечая клинику заболевания и число павших от ботулизма мышей.

Опыт сопровождают контролем опытной дозы токсина, для чего готовят смесь, содержащую 1 мл СО активности противоботулинической сыворотки соответствующего типа с исходной концентрацией 1 МЕ/мл и 1,5 мл токсина, содержащего 5 опытных доз. Смесь инкубируют при тех же условиях, что и испытуемую сыворотку и вводят ее внутривенно 4 белым мышам массой 16 – 18 г в объеме 0,5 мл. За животными наблюдают 4 сут, отмечая клинику заболевания и число мышей, павших от ботулизма.

Специфическую активность (титр) сыворотки рассчитывают, исходя из наибольшего ее разведения, которое в смеси с опытной дозой токсина обеспечивает защиту 100 % мышей от ботулизма. Тест не учитывают, если более 50 % мышей контрольной группы остались живы.

Удельная активность. Не менее 2000 МЕ на 0,1 г белка для противоботулинической сыворотки типа А, не менее 500 МЕ – для противоботули-

нической сыворотки типа В, не менее 1000 МЕ – для противоботулинической сыворотки типа Е.

Расчет удельной активности (*X*) производят по формуле:

$$X = \frac{T}{C \cdot 10},$$

где: *T* – титр сыворотки, МЕ/мл;

C – концентрация белка, г/мл;

10 – постоянный коэффициент.

Сульфат-ионы. Не более 0,025 %. Определение проводят колориметрическим методом. К 5 мл испытуемого образца и 5 мл рабочего эталонного раствора прибавляют по 0,5 мл 5 % раствора бария хлорида и перемешивают. Через 15 мин пробы перемешивают и измеряют оптическую плотность суспензий при длине волны 540 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм против контрольного раствора, содержащего 5 мл образца и 0,5 мл воды очищенной, для эталонного раствора – вода очищенная (5 мл).

Испытание проводят в 2 повторностях. Для расчета используется среднее значение.

Расчет содержания сульфат-ионов (*X*) в процентах производят по формуле:

$$X = \frac{0{,}002 \cdot A_{\text{опыт}}}{A_{\text{эталон}}},$$

где: $A_{\text{опыт}}$ – значение оптической плотности испытуемого образца;

$A_{\text{эталон}}$ – значение оптической плотности рабочего эталонного раствора;

0,002 –концентрация эталонного раствора калия сульфата (сульфат-ионы, %)

Примечания

1. Приготовление основного раствора калия сульфата (1 мг/мл сульфат-ионов). В мерной колбе вместимостью 1000 мл в воде очищенной растворяют 1,8140 г калия сульфата, высушенного до постоянной массы при температуре 100 – 105 °С, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 1 года.

2. Приготовление рабочего эталонного раствора калия сульфата (0,002 % сульфат-ионов). В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1 мл ос-

новного раствора калия сульфата, доводят водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Натрия хлорид. От 0,85 до 0,95 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение хлоридов методом обратного осадительного титрования в биологических лекарственных препаратах».

Хлороформ. Не более 0,1 %. Определение проводят колориметрическим методом, основанным на способности хлороформа образовывать с резорцином в щелочной среде соединение хиноидной структуры, которое дает цветную реакцию.

В пробирки вносят по 0,1 мл испытуемого образца и образца сравнения (0,1 % раствор хлороформа), добавляют 0,9 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, 2 мл 20 % раствора натрия гидроксида, 1 мл 10 % раствора резорцина и перемешивают. Содержимое пробирок перемешивают и нагревают на кипящей водяной бане в течение 1 мин. Пробы осторожно охлаждают до температуры 15 – 18 ^{0}С, затем измеряют оптическую плотность окрашенного раствора при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 5 мм по сравнению с контрольным раствором, состоящим из 1 мл воды очищенной, 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и 2 мл 20 % раствора натрия гидроксида. Раствор резорцина в контрольный раствор не добавляют, т.к. продукты его окисления окрашиваются в зеленый цвет.

Расчет содержания хлороформа проводят путем сравнения оптической плотности испытуемого образца и образца сравнения (0,1 % раствор хлороформа).

Содержание хлороформа (X) в процентах в испытуемом образце вычисляют по формуле:

$$X = \frac{0{,}1 \cdot A_{\text{исп}}}{A_{\text{ст}}},$$

где : $A_{\text{исп}}$ – значение оптической плотности испытуемого образца;

$A_{\text{ст}}$ – значение оптической плотности образца сравнения – 0,1 % раствора хлороформа.

0,1 – концентрация раствора хлороформа, %

Примечания

1. Приготовление 0,1 % раствора хлороформа. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,1 мл хлороформа, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор используют через 24 ч.

2. Приготовление 10 % раствора резорцина. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 5 г резорцина, растворяют в 30 мл воды очищенной, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 ºС. Замораживание не допускается.

Сыворотка противодифтерийная лошадиная ФС.3.3.1.0043.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на сыворотку противодифтерийную лошадиную, которая представляет собой иммуноглобулиновую фракцию сыворотки крови лошади, содержащую специфические антитела, нейтрализующие дифтерийный экзотоксин. Сыворотка противодифтерийная лошадиная предназначена для экстренной профилактики и лечения дифтерии.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство сыворотки дифтерийной лошадиной должно быть валидировано с целью подтверждения установленных требований, гарантирующих её качество и безопасность применения.

Сыворотку получают из плазмы крови лошадей, гипериммунизированных дифтерийным анатоксином. Для получения очищенной, концентрированной иммуноглобулиновой фракции плазмы крови лошади, содержащей антитела (антитоксины), нейтрализующие дифтерийный токсин, применяют методы солевого фракционирования, ферментолиза, мембранной фильтрации.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость с желтоватым оттенком, без осадка. Определение проводят визуально.

Подлинность. Сыворотка должна нейтрализовывать действие дифтерийного токсина. Определение проводят, как описано в разделе «Специфическая активность».

Прозрачность. Показатель оптической плотности не должен превышать 0,05. Определение проводят фотометрическим методом в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей» при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 3 мм по сравнению с водой очищенной, если нет других указаний в нормативной документации.

Цветность. Показатель оптической плотности не должен превышать 0,15. Определение проводят фотометрическим методом в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей» при длине волны 400 нм в кювете с толщиной слоя 3 мм по сравнению с водой очищенной, если нет других указаний в нормативной документации.

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH. От 6,8 до 7,2. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Содержание белка. От 8 до 12 %. Определение проводят колориметрическим методом с биуретовым реактивом в соответствии с ОФС «Количественное определение белка колориметрическим методом с биуретовым реактивом в препаратах крови человека и животных». Метод А.

Стерильность. Должна быть стерильной. Испытания проводят методами прямого посева или мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность. Должна быть апирогенной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Вводят 1 мл неразведенной сыворотки на 1 кг массы кролика. В нормативной документации указывают допустимые пределы изменений температуры животных и тест-дозу.

Аномальная токсичность. Должна быть нетоксичной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность», если в нормативной документации нет других указаний.

Специфическая активность. Не менее 1500 МЕ (международных единиц) в 1 мл. Специфическую активность противодифтерийной сыворотки определяют в тесте нейтрализации дифтерийного токсина на морских свинках по методу Рёмера и выражают в МЕ/мл. (1 МЕ дифтерийного антитоксина – это специфически нейтрализующая активность антитоксической сыворотки в отношении дифтерийного токсина, которая содержится в определенном количестве международного стандартного образца, представляющего собой противодифтерийную лиофилизированную лошадиную сыворотку).

Определение опытной некротической дозы дифтерийного токсина. Опытная дермонекротическая доза ($Ln/_{50}$) дифтерийного токсина представляет собой наименьшее количество токсина, которое в смеси с 1/50 МЕ противодифтерийной сыворотки при внутрикожном введении морским свинкам в объеме 0,05 мл вызывает некроз кожи к 4 - 5 сут.

При определении $Ln/_{50}$ дифтерийного токсина используют стандартный образец (СО) активности противодифтерийной сыворотки, калиброванный в МЕ, который разводят 0,9 % раствором натрия хлорида с таким расчетом, чтобы в 1 мл раствора содержалось 2/5 МЕ (соответственно в 0,05 мл 1/50 МЕ). Готовят несколько (не менее 5) разведений дифтерийного токсина, различающихся между собой по активности на 10 – 20 %. Для разведения дифтерийного токсина используют 0,9 % раствор натрия хлорида.

За 1 сут до проведения теста участки кожи на боках морских свинок освобождают от шерсти и подшерстка, не допуская ее повреждения. Свинок черной масти и альбиносов не используют. При определении $Ln/_{50}$ дифтерийного токсина 1 морской свинке делают не более 4 инъекций.

Смешивают 1 мл противодифтерийной лошадиной сыворотки и 1 мл одного из разведений дифтерийного токсина. Смеси выдерживают при температуре (37 ± 1) ºС в течение (30 ± 1) мин и вводят по 0,1 мл внутрикожно

не менее чем 2 морским свинкам массой (425 ± 25) г. Для инъекций используют шприцы с иглами, имеющими угол скоса не менее 30 º. Результаты реакции учитывают ежедневно в течение 5 сут. В зависимости от количества дифтерийного токсина, оставшегося не связанным с противодифтерийной сывороткой, на месте введения смеси токсина и сыворотки может возникнуть эритема, инфильтрат или некроз. При полной нейтрализации дифтерийного токсина антитоксином реакция на месте инъекции должна отсутствовать.

Определение специфической активности (титра) противодифтерийной сыворотки. Исходя из предполагаемой активности, сыворотку разводят 0,9 % раствором натрия хлорида до концентрации 0,4 МЕ/мл (2/5 МЕ в 1 мл). Готовят несколько разведений, отличающихся друг от друга по активности на 10 – 20 %.

По 1 мл каждого разведения сыворотки смешивают с 1 мл рабочего разведения дифтерийного токсина. Полученные смеси осторожно перемешивают, избегая пенообразования и после выдерживания при температуре (37 ± 1) ºС в течение (30 ± 1) мин вводят 2 морским свинкам массой (425 ± 25) г подкожно в объеме 0,1 мл.

Для контроля опытной некротической дозы каждой морской свинке вводят 0,1 мл смеси, содержащей 1 $Ln/_{50}$ дифтерийного токсина и 1/50 МЕ стандартного образца активности противодифтерийной сыворотки. За животными наблюдают 5 сут, отмечая развитие кожных реакций.

Специфическую активность (титр) сыворотки следует рассчитывать по наибольшему ее разведению, которое при внутрикожном введении в смеси с дифтерийным токсином не вызывает у морских свинок кожной реакции к 4 – 5 сут.

Удельная активность. Не менее 1300 МЕ на 0,1 г белка. Удельную активность (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{T}{C \cdot 10},$$

где *T* – титр сыворотки, МЕ/мл;

C – концентрация белка, г/мл;

10 – постоянный коэффициент.

Сульфат-ионы. Не более 0,025 %. Определение проводят колориметрическим методом. К 5 мл испытуемого образца и к 5 мл рабочего эталонного раствора прибавляют по 0,5 мл 5 % раствора бария хлорида и перемешивают. Через 15 мин пробы перемешивают и измеряют оптическую плотность суспензий при длине волны 540 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм против контрольного раствора, содержащего 5 мл образца и 0,5 мл воды очищенной, для эталонного раствора – вода очищенная (5 мл).

Испытание проводят в 2 повторностях. Для расчета используется среднее значение.

Расчет содержания сульфат-ионов (*X*) в процентах проводят по формуле:

$$X = \frac{0{,}002 \cdot A_{\text{опыт}}}{A_{\text{эталон}}},$$

где: $A_{\text{опыт}}$ – значение оптической плотности испытуемого образца;

$A_{\text{эталон}}$ – значение оптической плотности рабочего эталонного раствора;

0,002 –концентрация эталонного раствора калия сульфата (сульфат-ионы, %)

Примечания.

1. Приготовление основного раствора калия сульфата (1 мг/мл сульфат-ионов). В мерной колбе вместимостью 1000 мл в воде очищенной растворяют 1,8140 г калия сульфата, высушенного до постоянной массы при температуре 100 – 105 °С, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 1 года.

2. Приготовление рабочего эталонного раствора калия сульфата (0,002 % сульфат-ионов). В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1 мл основного раствора калия сульфата, доводят водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Натрия хлорид. От 0,85 до 0,95 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение хлоридов методом обратного осадительного титрования в биологических лекарственных препаратах».

Хлороформ. Не более 0,1 %. Определение проводят колориметрическим методом, основанным на способности хлороформа образовывать с резорцином в щелочной среде соединение хиноидной структуры, которое дает цветную реакцию.

В пробирки вносят по 0,1 мл испытуемого образца и образца сравнения (0,1 % раствор хлороформа), добавляют 0,9 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, 2 мл 20 % раствора натрия гидроксида, 1 мл 10 % раствора резорцина и перемешивают. Содержимое пробирок перемешивают и нагревают на кипящей водяной бане в течение 1 мин. Пробы осторожно охлаждают до температуры 15 – 18 ^{0}С, затем измеряют оптическую плотность окрашенного раствора при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 5 мм по сравнению с контрольным раствором, состоящим из 1 мл воды очищенной, 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и 2 мл 20 % раствора натрия гидроксида. Раствор резорцина в контрольный раствор не добавляют, т.к. продукты его окисления окрашиваются в зеленый цвет.

Расчет содержания хлороформа проводят путем сравнения оптической плотности испытуемого образца и образца сравнения (0,1 % раствор хлороформа).

Содержание хлороформа (X) в процентах в испытуемом образце вычисляют по формуле:

$$X = \frac{0{,}1 \cdot A\,\text{исп}}{A\,\text{ст}},$$

где: $A_{\text{исп}}$ – значение оптической плотности испытуемого образца;

$A_{\text{ст}}$ – значение оптической плотности образца сравнения – 0,1 % раствора хлороформа.

0,1 – концентрация раствора хлороформа, %

Примечания

1. Приготовление 0,1 % раствора хлороформа. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,1 мл хлороформа, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор используют через 24 часа.

2. Приготовление 10 % раствора резорцина. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 5 г резорцина, растворяют в 30 мл воды очищенной, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объём лекарственных форм для парентерального применения».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 ºС. Замораживание не допускается.

Сыворотка противостолбнячная лошадиная ФС.3.3.1.0044.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на сыворотку противостолбнячную лошадиную, представляющую собой иммуноглобулиновую фракцию сыворотки крови лошади, содержащую специфические антитела, нейтрализующие столбнячный токсин. Сыворотка противостолбнячная лошадиная применяется для экстренной профилактики и лечения столбняка.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство сыворотки противостолбнячной должно быть валидировано с целью подтверждения установленных требований, гарантирующих её качество и безопасность применения.

Сыворотку получают из плазмы крови лошадей, гипериммунизированных столбнячным анатоксином/токсином. Для получения очищенной концентрированной иммуноглобулиновой фракции плазмы крови лошади, содержащей антитела (антитоксины), нейтрализующие столбнячный экзотоксин, применяют методы солевого фракционирования, ферментолиза, мембранной фильтрации.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость с желтоватым оттенком, без осадка. Определение проводят визуально.

Подлинность. Сыворотка должна нейтрализовывать действие столбнячного токсина. Определение проводят по разделу «Специфическая активность».

Прозрачность. Показатель оптической плотности не должен превышать 0,05. Определение проводят фотометрическим методом при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 3 мм, если нет других указаний в нормативной документации.

Цветность. Показатель оптической плотности не должен превышать 0,15. Определение проводят фотометрическим методом при длине волны 400 нм в кювете с толщиной слоя 3 мм, если нет других указаний в нормативной документации.

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH. От 6,8 до 7,2. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Содержание белка. От 8 до 12 %. Определение проводят колориметрическим методом с биуретовым реактивом в соответствии с ОФС «Количественное определение белка колориметрическим методом с биуретовым реактивом в препаратах крови человека и животных». Метод А.

Стерильность. Должна быть стерильной. Испытания проводят методами прямого посева или мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность. Должна быть апирогенной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность», если нет других указаний в нормативной документации. Указывают допустимые пределы изменения температуры тела животных и тест-дозу. Вводят 1 мл неразведенной сыворотки на 1 кг массы кролика.

Аномальная токсичность. Должна быть нетоксичной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность», если в нормативной документации нет других указаний.

Специфическая активность. Не менее 1200 **м**еждународных единиц (МЕ) в 1 мл. Специфическую активность противостолбнячной сыворотки определяют в тесте нейтрализации столбнячного токсина по методу Эрлиха и выражают в МЕ/мл (1 МЕ столбнячного антитоксина – это специфически нейтрализующая активность антитоксической сыворотки в отношении столбнячного токсина, которая содержится в определенном количестве международного стандартного образца, представляющего собой противостолбнячную лиофилизированную лошадиную сыворотку).

Определение опытной дозы столбнячного токсина. Опытная доза столбнячного токсина ($L+/_{100}$) представляет собой наименьшее количество токсина, которое в смеси с 0,01 МЕ противостолбнячной сыворотки при введении мышам в объеме 0,4 мл вызывает гибель 50 % мышей (с явлениями столбняка) на 4 сут.

Готовят несколько разведений столбнячного токсина, различающихся между собой на 10 – 20 %.

При определении опытной летальной дозы столбнячного токсина используют стандартный образец (СО) активности противостолбнячной сыворотки, калиброванный в МЕ по отношению к соответствующему международному стандартному образцу. СО разводят 0,9 % раствором натрия хлорида до концентрации 0,1 МЕ/мл. Готовят смеси, состоящие из 1 мл СО активности противостолбнячной лошадиной сыворотки, 2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и 1 мл одного из разведений столбнячного токсина. Смеси токсина с сывороткой осторожно перемешивают и инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (45 ± 1) мин, затем вводят по 0,4 мл 4 белым мышам массой (17 ± 1) г под кожу бедра. За животными наблюдают 4 сут. От-

мечают разведение токсина, которое в смеси со СО активности противостолбнячной сыворотки вызвало гибель от столбняка 50 % животных.

Определение специфической активности (титра) противостолбнячной сыворотки. Исходя из предполагаемой активности, сыворотку разводят 0,9 % раствором натрия хлорида до концентрации 0,1 МЕ/мл. Готовят несколько разведений, отличающихся друг от друга по активности на 10 – 20 %.

По 1 мл каждого разведения испытуемой сыворотки переносят во флаконы, добавляют по 2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и 10 опытных доз столбнячного токсина в объеме 1 мл. Полученные смеси осторожно перемешивают, избегая пенообразования, и после выдерживания при температуре (37 ± 1) ºС в течение (45 ± 1) мин вводят 4 белым мышам массой (17 ± 1) г под кожу бедра в объеме 0,4 мл.

Опыт сопровождают контролем опытной дозы токсина, для чего готовят смесь, содержащую 1 мл СО активности противостолбнячной сыворотки, разведенного до концентрации 0,1 МЕ/мл, 1 мл токсина, содержащего 10 опытных доз, и 2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Смесь инкубируют при тех же условиях, что и испытуемую сыворотку, и вводят ее 4 белым мышам массой (17 ± 1) г под кожу бедра в объеме 0,4 мл. За животными опытной и контрольной групп наблюдают 4 сут, отмечая количество павших от столбняка мышей.

Специфическую активность (титр) сыворотки рассчитывают, исходя из наибольшего ее разведения, которое в смеси с опытной дозой токсина обеспечивает защиту 100 % мышей от столбняка. Тест не учитывают, если все мыши в контрольной группе остались живы без признаков столбняка.

Удельная активность. Не менее 1000 МЕ на 0,1 г белка. Удельную активность (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{T}{C \cdot 10},$$

где: T – титр сыворотки, МЕ/мл;

C – концентрация белка, г/мл;

10 – постоянный коэффициент.

Сульфат-ионы. Не более 0,025 %. Определение проводят колориметрическим методом. К 5 мл испытуемого образца и 5 мл рабочего эталонного раствора прибавляют по 0,5 мл 5 % раствора бария хлорида и перемешивают. Через 15 мин пробы перемешивают и измеряют оптическую плотность суспензий при длине волны 540 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм против контрольного раствора, содержащего 5 мл образца и 0,5 мл воды очищенной, для эталонного раствора – вода очищенная (5 мл).

Испытание проводят в 2 повторностях. Для расчета используется среднее значение.

Расчет содержания сульфат-ионов (X) в процентах производят по формуле:

$$X = \frac{0{,}002 \cdot A\,\text{опыт}}{A\,\text{эталон}},$$

где: $A_{\text{опыт}}$ – значение оптической плотности испытуемого образца;

$A_{\text{эталон}}$ – значение оптической плотности рабочего эталонного раствора;

0,002 –концентрация эталонного раствора калия сульфата (сульфат-ионы, %)

Примечания

1. Приготовление основного раствора калия сульфата (1 мг/мл сульфат-ионов). В мерной колбе вместимостью 1000 мл в воде очищенной растворяют 1,8140 г калия сульфата, высушенного до постоянной массы при температуре 100 – 105 °С, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 1 года.

2. Приготовление рабочего эталонного раствора калия сульфата (0,002 % сульфат-ионов). В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1 мл основного раствора калия сульфата, доводят водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Натрия хлорид. От 0,85 до 0,95 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение хлоридов методом обратного осадительного титрования в биологических лекарственных препаратах».

Хлороформ. Не более 0,1 %. Определение проводят колориметрическим методом, основанным на способности хлороформа образовывать с резорцином в щелочной среде соединение хиноидной структуры, которое дает цветную реакцию.

В пробирки вносят по 0,1 мл испытуемого образца и образца сравнения (0,1 % раствор хлороформа), добавляют 0,9 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, 2 мл 20 % раствора натрия гидроксида, 1 мл 10 % раствора резорцина и перемешивают. Содержимое пробирок перемешивают и нагревают на кипящей водяной бане в течение 1 мин. Пробы осторожно охлаждают до температуры 15 – 18 ^{0}С, затем измеряют оптическую плотность окрашенного раствора при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 5 мм по сравнению с контрольным раствором, состоящим из 1 мл воды очищенной, 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и 2 мл 20 % раствора натрия гидроксида. Раствор резорцина в контрольный раствор не добавляют, т.к. продукты его окисления окрашиваются в зеленый цвет.

Расчет содержания хлороформа проводят путем сравнения оптической плотности испытуемого образца и образца сравнения (0,1 % раствор хлороформа).

Содержание хлороформа (X) в процентах в испытуемом образце вычисляют по формуле:

$$X = \frac{0{,}1 \cdot A_{\text{исп}}}{A_{\text{ст}}},$$

где: $A_{\text{исп}}$ – значение оптической плотности испытуемого образца;

$A_{\text{ст}}$ – значение оптической плотности образца сравнения – 0,1 % раствора хлороформа.

0,1 – концентрация раствора хлороформа, %

Примечания

1. Приготовление 0,1 % раствора хлороформа. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,1 мл хлороформа, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор используют через 24 часа.

2. Приготовление 10 % раствора резорцина. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 5 г резорцина, растворяют в 30 мл воды очищенной, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объём лекарственных форм для парентерального применения».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 ºС. Замораживание не допускается.

Сыворотка против яда змеи гадюки обыкновенной лошадиная	ФС.3.3.1.0045.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на сыворотку против яда змеи гадюки лошадиную, представляющую собой иммуноглобулиновую фракцию сыворотки лошади, содержащую специфические антитела, нейтрализующие яд змеи гадюки обыкновенной.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство сыворотки против яда змеи гадюки лошадиной должно быть валидировано с целью подтверждения установленных требований, гарантирующих качество и безопасность ее применения.

Сыворотку получают из плазмы крови лошадей, иммунизированных ядом змеи гадюки. Для получения очищенной, концентрированной иммуноглобулиновой фракции плазмы крови лошади, содержащей антитела, нейтрализующие яд змеи гадюки, применяют методы солевого фракционирования, ферментолиза, мембранной фильтрации.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость с желтоватым оттенком, без осадка. Определение проводят визуально.

Прозрачность. Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость. Показатель оптической плотности не должен превышать 0,05. Определение проводят фотометрическим методом при длине волны 540 нм в кювете тол-

щиной слоя 3 мм против контрольного раствора – воды очищенной, если нет других указаний в нормативной документации.

Цветность. Жидкость с желтоватым оттенком. Показатель оптической плотности не должен превышать 0,15. Определение проводят фотометрическим методом при длине волны 400 нм в кювете с толщиной слоя 3 мм по сравнению с контрольным раствором – водой очищенной, если нет других указаний в нормативной документации.

pH. От 6,8 до 7,2. Определение проводят методом потенциометрического титрования в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Подлинность. Сыворотка должна нейтрализовать действие яда змеи гадюки обыкновенной. Определение проводят, как описано в разделе «Специфическая активность».

Содержание белка. От 8 до 12 %. Определение проводят колориметрическим методом с биуретовым реактивом в соответствии с ОФС «Количественное определение белка колориметрическим методом с биуретовым реактивом в препаратах крови человека и животных» Метод А.

Стерильность. Должна быть стерильной. Испытания проводят методами прямого посева или мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность. Должна быть апирогенной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Указывают допустимые пределы изменений температуры у животных и тест-дозу. Если не указано иначе, вводят 1 мл неразведенной сыворотки на 1 кг массы кролика.

Аномальная токсичность. Должна быть нетоксичной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность», если не указано иначе в нормативной документации.

Специфическая активность. Не менее 50 антитоксических единиц (АЕ) в 1 мл. Специфическую активность сыворотки устанавливают по ее способности нейтрализовать яд гадюки и выражают в антитоксических единицах (АЕ). За одну антитоксическую единицу принимают количество сыво-

ротки, которое в смеси с 3 LD_{50} яда гадюки защищает от гибели 50 % мышей, взятых в опыт (LD_{50} – доза яда гадюки, вызывающая гибель 50 % взятых в опыт животных в течение 2 сут).

Определение LD_{50} яда гадюки. Яд гадюки разводят в стерильном 0,9 % растворе натрия хлорида. Готовят 5–6 разведений, концентрация каждого из которых больше концентрации предшествующего в 1,1 или 1,2 раза (шаг разведений 1,1 или 1,2 соответственно). Разведения яда готовят таким образом, чтобы наибольшее разведение (содержащее наименьшее количество яда) не вызывало гибели, а наименьшее разведение с максимальной дозой токсина вызывало гибель 100 % мышей. Каждое разведение вводят мышам массой 16 – 18 г внутривенно в объеме 0,5 мл. За животными наблюдают в течение 2 сут, регистрируя количество павших животных. LD_{50} яда рассчитывают по формуле Кербера:

$$\lg LD_{50} = \lg D - \sigma\,(\Sigma L_i - 0{,}5),$$

где: $\lg D$ – логарифм максимальной из испытанных доз яда;
L_i – отношение числа павших к общему числу мышей, получивших одно и то же разведение яда;
σ – логарифм шага разведений.

Определение специфической активности сыворотки против яда гадюки. Для разведения испытуемой сыворотки и яда используют стерильный 0,9 % раствор натрия хлорида.

Испытуемую сыворотку разводят так, чтобы, исходя из ее предполагаемой активности, получить несколько разведений, отличающихся одно от другого на 10 - 20 %. Яд гадюки разводят до содержания 10 LD_{50} в 1 мл (3 LD_{50} в 0,3 мл). Готовят смеси яда змеи и подготовленных разведений испытуемой сыворотки, в которых на 0,2 мл сыворотки должно приходиться 0,3 мл яда. Общий объем смеси должен быть достаточен для введения по 0,5 мл 5 – 6 мышам. Смеси яда и разведений сывороток инкубируют 45 мин при температуре (37 ± 0,5) ºС и вводят внутривенно в объеме 0,5 мл мышам массой 16 – 18 г. Каждый опыт сопровождают контролем активности яда змеи.

Для контроля готовят не менее 3 доз яда, содержащих 0,75; 1,5; 3 LD_{50} в объеме 0,5 мл.

За животными наблюдают в течение 2 сут, регистрируя количество выживших в каждой группе.

Активность сыворотки рассчитывают по наибольшему ее разведению, которое при внутривенном введении мышам в смеси с 3 LD_{50} яда змеи обеспечивает защиту 50 % животных.

Удельная активность. Не менее 50 АЕ на 0,1 г белка. Удельную активность (X) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{T}{C \cdot 10},$$

где: T – титр сыворотки, МЕ/мл;

C – концентрация белка, г/мл;

10 – постоянный коэффициент.

Сульфат-ионы. Не более 0,025 %. Определение проводят колориметрическим методом. К 5 мл испытуемого образца и 5 мл рабочего эталонного раствора прибавляют по 0,5 мл 5 % раствора бария хлорида и перемешивают. Через 15 мин пробы перемешивают и измеряют оптическую плотность суспензий при длине волны 540 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм против контрольного раствора, содержащего 5 мл образца и 0,5 мл воды очищенной, эталонный раствор – вода очищенная (5 мл).

Испытание проводят в 2 повторностях. Для расчета используется среднее значение.

Расчет содержания сульфат-ионов в процентах производят по формуле:

$$X = \frac{0{,}002 \cdot A\,\text{опыт}}{A\,\text{эталон}},$$

где: $A_{\text{опыт}}$ – значение оптической плотности испытуемого образца;

$A_{\text{эталон}}$ – значение оптической плотности рабочего эталонного раствора;

0,002 –концентрация эталонного раствора калия сульфата (сульфат-ионы, %)

Примечания

1. Приготовление основного раствора калия сульфата (1 мг/мл сульфат-ионов). В мерной колбе вместимостью 1000 мл в воде очищенной растворяют 1,8140 г калия сульфата, высушенного до постоянной массы при температуре 100 – 105 °С, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 1 года.

2. Приготовление рабочего эталонного раствора калия сульфата (0,002 % сульфат-ионов). В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1 мл основного раствора калия сульфата, доводят водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Натрия хлорид. От 0,85 до 0,95 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение хлоридов методом обратного осадительного титрования в биологических лекарственных препаратах».

Хлороформ. Не более 0,1 %. Определение проводят колориметрическим методом, основанным на способности хлороформа образовывать с резорцином в щелочной среде соединение хиноидной структуры, которое дает цветную реакцию.

В пробирки вносят по 0,1 мл испытуемого образца и образца сравнения (0,1 % раствор хлороформа), добавляют 0,9 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, 2 мл 20 % раствора натрия гидроксида, 1 мл 10 % раствора резорцина и перемешивают. Затем пробирки нагревают на кипящей водяной бане в течение 1 мин. Пробы осторожно охлаждают до температуры 15–18 ^{0}С, измеряют оптическую плотность окрашенного раствора при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 5 мм по сравнению с контрольным раствором, состоящим из 1 мл воды очищенной, 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и 2 мл 20 % раствора натрия гидроксида. Раствор резорцина в контрольный раствор не добавляют, т.к. продукты его окисления окрашиваются в зеленый цвет.

Расчет содержания хлороформа проводят путем сравнения оптической плотности испытуемого образца и образца сравнения (0,1 % раствор хлороформа).

Содержание хлороформа (X) в процентах в испытуемом образце вычисляют по формуле:

$$X = \frac{0{,}1 \cdot A\,\text{исп}}{A\,\text{ст}},$$

где: $A_{\text{исп}}$ – значение оптической плотности испытуемого образца;

$A_{\text{ст}}$ – значение оптической плотности образца сравнения – 0,1 % раствора хлороформа.

0,1 – концентрация раствора хлороформа, %

Примечания

1. Приготовление 0,1 % раствора хлороформа. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,1 мл хлороформа, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор используют через 24 часа.

2. Приготовление 10 % раствора резорцина. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 5 г резорцина, растворяют в 30 мл воды очищенной, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения»

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 ºС. Замораживание не допускается.

Сыворотка лошадиная, разведенная 1:100 — ФС.3.3.1.0046.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на сыворотку лошадиную, разведенную 1:100, представляющую собой иммуноглобулиновую фракцию сыворотки крови лошадей, разведенную 1:100, которая предназначена для определения чувствительности человека к белкам сыворотки лошади.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство сыворотки лошадиной должно быть валидировано с целью подтверждения установленных требований, гарантирующих её качество и безопасность применения.

Для получения сыворотки лошадиной, разведенной 1:100, антитоксические сыворотки, содержащие специфические антитела к дифтерийному, столбнячному, гангренозному или ботулиническим токсинам, а также к гетерологичным иммуноглобулинам разводят стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида в соотношении 1:100.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачная бесцветная жидкость. Определение проводят визуально.

Подлинность. Должна быть видоспецифична. Определение проводят с помощью иммунохимических методов, позволяющих подтвердить наличие в

препарате белков крови лошади. Метод определения указывают в нормативной документации.

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH. От 6,7 до 7,3. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Содержание белка. От 0,08 до 0,13 %. Определение проводят колориметрическим методом с биуретовым реактивом в соответствии с ОФС «Количественное определение белка колориметрическим методом с биуретовым реактивом в препаратах крови человека и животных» Метод Б.

Стерильность. Должна быть стерильной. Испытания проводят методами прямого посева или мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность. Должна быть апирогенной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Вводят 1 мл сыворотки на 1 кг массы кролика. В нормативной документации указывают допустимые пределы изменений температуры животных.

Аномальная токсичность. Должна быть нетоксичной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

Сульфат-ионы. Не более 0,025 %. Определение проводят колориметрическим методом. К 5 мл испытуемого образца и 5 мл рабочего эталонного раствора прибавляют по 0,5 мл 5 % раствора бария хлорида и перемешивают. Через 15 мин пробы перемешивают и измеряют оптическую плотность суспензий при длине волны 540 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм против контрольного раствора, содержащего 5 мл образца и 0,5 мл воды очищенной, для эталонного раствора – вода очищенная (5 мл).

Испытание проводят в 2 повторностях. Для расчета используется среднее значение.

Расчет содержания сульфат-ионов (*X*) в процентах производят по формуле:

$$X = \frac{0{,}002 \cdot A\,\text{опыт}}{A\,\text{эталон}},$$

где: $A_{\text{опыт}}$ – значение оптической плотности испытуемого образца;

$A_{\text{эталон}}$ – значение оптической плотности рабочего эталонного раствора;

0,002 –концентрация эталонного раствора калия сульфата (сульфат-ионы, %)

Примечания

1. Приготовление основного раствора калия сульфата (1 мг/мл сульфат-ионов). В мерной колбе вместимостью 1000 мл в воде очищенной растворяют 1,8140 г калия сульфата, высушенного до постоянной массы при температуре 100 – 105 °С, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 1 года.

2. Приготовление рабочего эталонного раствора калия сульфата (0,002 % сульфат-ионов). В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1 мл основного раствора калия сульфата, доводят водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Натрия хлорид. От 0,85 до 0,95 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение хлоридов методом осадительного титрования в биологических лекарственных препаратах».

Хлороформ. Не более 0,1 %. Определение проводят колориметрическим методом, основанным на способности хлороформа образовывать с резорцином в щелочной среде соединение хиноидной структуры, которое дает цветную реакцию. В пробирки вносят по 0,1 мл испытуемого образца и образца сравнения (0,1 % раствор хлороформа), добавляют 0,9 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, 2 мл 20 % раствора натрия гидроксида, 1 мл 10 % раствора резорцина и перемешивают. Содержимое пробирок перемешивают и нагревают на кипящей водяной бане в течение 1 мин. Пробы осторожно охлаждают до температуры 15 – 18 ^{0}С, затем измеряют оптическую плотность окрашенного раствора при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 5 мм по сравнению с контрольным раствором, состоящим из 1 мл воды очищенной, 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и 2 мл 20 % раствора натрия

гидроксида. Раствор резорцина в контрольный раствор не добавляют, т.к. продукты его окисления окрашиваются в зеленый цвет. Расчет содержания хлороформа проводят путем сравнения оптической плотности испытуемого образца и образца сравнения (0,1 % раствор хлороформа).

Содержание хлороформа (*X*) в процентах в испытуемом образце вычисляют по формуле:

$$X = \frac{0{,}1 \cdot A\,\text{исп}}{A\,\text{ст}},$$

где: $A_{\text{исп}}$ – значение оптической плотности испытуемого образца;

$A_{\text{ст}}$ – значение оптической плотности образца сравнения – 0,1 % раствора хлороформа.

0,1 – концентрация раствора хлороформа, %

Примечания

1. Приготовление 0,1 % раствора хлороформа. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,1 мл хлороформа, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор используют через 24 часа.
2. Приготовление 10 % раствора резорцина. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 5 г резорцина, растворяют в 30 мл воды очищенной, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объём».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 ºС. Замораживание не допускается.

Пирогенал, ФС.3.3.1.0047.15

раствор для внутримышечного введения

Настоящая фармакопейная статья распространяется на препарат пирогенал, раствор для внутримышечного введения, который представляет собой липополисахарид, выделенный из клеток *Salmonella typhi* и растворенный в фосфатно-солевом буферном растворе.

ПРОИЗВОДСТВО

Технология получения липополисахарида (ЛПС) предусматривает культивирование производственного штамма (штамма-продуцента) в полусинтетической питательной среде, инактивацию микробных клеток формалином, поэтапное выделение и очистку ЛПС ферментативными методами.

Производственный штамм *S. typhi* Ty2 4446 должен обладать типичными морфологическими, культуральными, биохимическими свойствами:

- на плотной питательной среде (мясопептонный агар) должен образовывать круглые, гладкие, выпуклые, блестящие колонии (S-форма);

- на висмут-сульфитном агаре должен образовывать блестящие колонии черного цвета;

- в мазках, окрашенных по Граму, должны присутствовать грамотрицательные палочки с закругленными концами;

- должен ферментировать глюкозу, маннит и мальтозу с образованием кислоты без газа;

- должен продуцировать сероводород;

- не должен ферментировать лактозу и сахарозу;

- не должен образовывать индол;

- LD_{50} штамма при внутрибрюшинном заражении белых беспородных мышей должна быть не более $5 \cdot 10^7$ микробных клеток.

Основные этапы производства препарата

1) Получение биомассы и ее инактивация;

2) Концентрирование методом сепарирования;

3) Поэтапное выделение и очистка ЛПС ферментативными методами;

4) Получение готовой лекарственной формы препарата.

На этапе культивирования используют полусинтетическую питательную среду. Полученную биомассу проверяют на микробиологическую чистоту и типичность морфологии; проводят контроль биохимических свойств микроорганизмов; антигенные свойства проверяют в реакции агглютинации. Инактивацию микробных клеток проводят формалином, по окончании процесса инактивированную биомассу высевают на дифференциально-диагностическую питательную среду висмут-сульфитный агар для подтверждения отсутствия роста сальмонелл.

Инактивированную культуральную жидкость подвергают ферментативному гидролизу и сепарированию; из гидролизата ферментативными методами поэтапно выделяют ЛПС, а затем лиофилизируют, получая субстанцию-лиофилизат очищенного ЛПС.

На стадии производства субстанцию испытывают по следующим показателям:

Описание. Порошок светло-кремового цвета. Определение проводят визуально.

Белок. Не более 3 %. Испытания проводят колориметрическим методом по методу Лоури в соответствии с ОФС «Определение белка колориметрическим методом (метод Лоури) в биологических лекарственных препара-

тах»». Приготовление испытуемого образца ЛПС указывается в нормативной документации.

Нуклеиновые кислоты. Не более 5 %. Испытания проводят методом Спирина в соответствии с ОФС «Определение нуклеиновых кислот по методу Спирина в биологических лекарственных препаратах». Приготовление испытуемого образца липополисахарида указывается в нормативной документации.

Углеводы. От 40 до 60 %. Испытания проводят с антроновым реактивом в соответствии с ОФС «Определение сахаров спектрофотометрическим методом». Приготовление испытуемого образца ЛПС указывается в нормативной документации.

Безвредность. Препарат должен быть безвредным. Испытания проводят на 5 здоровых белых мышах массой (17 ± 1) г, которым внутрибрюшинно вводят 1 мл раствора ЛПС с концентрацией 100 мкг/мл; срок наблюдения за животными составляет 5 дней. Приготовление испытуемого образца ЛПС указывается в нормативной документации.

Оптическая плотность. Показания оптической плотности раствора ЛПС при 256 нм не должны превышать 0,300; при 280 нм – не более 0,200. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимых областях». Приготовление испытуемого образца ЛПС указывается в нормативной документации.

Потеря массы при высушивании. Не более 10 %. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Определение минимальной пирогенной дозы (МПД) рабочей серии ЛПС. Одна МПД должна составлять (0,0075 ± 0,0025) мкг ЛПС. Предварительно готовят раствор ЛПС в концентрации 100 мкг/мл, затем путем последовательных десятикратных разведений получают раствор с концентрацией 0,01 мкг/мл и из него – раствор с концентрацией 0,0075 мкг/мл (к 9 мл испытуемого образца с концентрацией 0,01 мкг/мл прибавляют 3 мл 0,9 % раство-

ра натрия хлорида). Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». За 1 ч до опыта у каждого кролика дважды с интервалом не менее 30 мин измеряют ректальную температуру. Различия в показаниях температуры у одного и того же животного не должны превышать 0,2 °С. Животным вводят раствор препарата с концентрацией 0,0075 мкг/мл внутривенно из расчета 1 мл на 1 кг массы тела. Средний показатель повышения температуры должен составлять от 0,6 до 0,8 °С.

В случае, если средний показатель повышения температуры будет ниже 0,6 °С, вводят раствор препарата с концентрацией 0,01 мкг/мл по 1 мл на 1 кг массы животного; если средний показатель повышения температуры будет выше 0,8 °С, вводят раствор препарата с концентрацией 0,005 мкг/мл по 1 мл на 1 кг массы животного. Повторный контроль проводят на том же количестве кроликов. Если при повторном испытании после введения растворов с концентрацией 0,01 или 0,005 мкг/мл средний показатель повышения температуры у животных составит ниже 0,6 °С или выше 0,8 °С соответственно, препарат бракуют. Минимальное количество вещества, вводимого внутривенно, на 1 кг массы кролика, вызывающее среднее повышение температуры тела на (0,6 – 0,8) °С, составляет минимальную пирогенную дозу (МПД). Одна МПД должна составлять (0,0075 ± 0,0025) мкг ЛПС.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачная бесцветная жидкость. Определение проводят визуально.

Подлинность. Препарат должен быть пирогенным. Одна минимальная пирогенная доза (МПД) должна составлять (0,0075 ± 0,0025) мкг ЛПС (раздел «Специфическая активность»).

Прозрачность. Должен быть прозрачным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Цветность. Должен быть бесцветным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

pH. От 6,7 до 7,3. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

Стерильность. Должен быть стерильным. Определяют методом прямого посева в соответствии с ОФС «Стерильность».

Аномальная токсичность. Должен быть нетоксичным. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Мышам массой (15 ± 1) г вводят внутрибрюшинно тест-дозу препарата объемом 1 мл. Период наблюдения за животными составляет 5 сут.

Специфическая активность. При введении 1 МПД на 1 кг массы кролика средний показатель повышения температуры должен быть от 0,6 до 0,8 °С. Препарат, в зависимости от концентрации активного вещества, разводят стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида до концентрации 10 мкг/мл. Затем путем последовательных десятикратных разведений готовят раствор с концентрацией 0,01 мкг/мл и из него – раствор с концентрацией 0,0075 мкг/мл (к 9 мл раствора препарата с концентрацией 0,01мкг/мл прибавляют 3 мл раствора натрия хлорида 0,9 %). Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». За 1 ч до опыта у каждого кролика дважды с интервалом не менее 30 мин измеряют ректальную температуру. Различия в показаниях температуры у одного и того же животного не должны превышать 0,2 °С. Животным вводят раствор препарата с концентрацией 0,0075 мкг/мл

внутривенно из расчета 1 мл на 1 кг массы тела. Средний показатель повышения температуры должен составлять от 0,6 до 0,8 °С.

В случае, если средний показатель повышения температуры будет ниже 0,6 °С, вводят раствор препарата с концентрацией 0,01 мкг/мл по 1 мл на 1 кг массы животного; если средний показатель повышения температуры будет выше 0,8 °С, вводят раствор препарата с концентрацией 0,005 мкг/мл по 1 мл на 1 кг массы животного. Повторный контроль проводят на том же количестве кроликов. Если при повторном испытании после введения растворов с концентрацией 0,01 или 0,005 мкг/мл средний показатель повышения температуры у животных составит ниже 0,6 °С или выше 0,8 °С соответственно, препарат бракуют.

Минимальное количество вещества, вводимого внутривенно, на 1 кг массы кролика, вызывающее среднее повышение температуры тела на 0,6 – 0,8 °С составляет МПД. Одна МПД должна составлять (0,0075 ± 0,0025) мкг ЛПС.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С.

Пирогенал, ФС.3.3.1.0048.15
суппозитории ректальные

Настоящая фармакопейная статья распространяется на препарат пирогенал, суппозитории ректальные, который представляет собой липополисахарид (ЛПС), выделенный из клеток *Salmonella typhi*.

ПРОИЗВОДСТВО

Технология получения ЛПС предусматривает культивирование производственного штамма (штамма-продуцента) в полусинтетической питательной среде, инактивацию микробных клеток формалином, поэтапное выделение и очистку ЛПС ферментативными методами.

Производственный штамм *S. typhi* Ty2 4446 должен обладать типичными морфологическими, культуральными, биохимическими свойствами:

- на плотной питательной среде (мясопептонный агар) должен образовывать круглые, гладкие, выпуклые, блестящие колонии (S-форма);

- на висмут-сульфитном агаре должен образовывать блестящие колонии черного цвета;

- в мазках, окрашенных по Граму, должны присутствовать грамотрицательные палочки с закругленными концами;

- должен ферментировать глюкозу, маннит и мальтозу с образованием кислоты без газа;

- должен продуцировать сероводород;

- не должен ферментировать лактозу и сахарозу;

- не должен образовывать индол;

- LD_{50} штамма при внутрибрюшинном заражении белых беспородных мышей должна быть не более $5 \cdot 10^7$ микробных клеток.

Основные этапы производства препарата

1) Получение биомассы и ее инактивация;

2) Концентрирование методом сепарирования;

3) Поэтапное выделение и очистка ЛПС ферментативными методами;

4) Получение готовой лекарственной формы препарата.

На этапе культивирования используют полусинтетическую питательную среду. Полученную биомассу проверяют на микробиологическую чистоту и типичность морфологии; проводят контроль биохимических свойств микроорганизмов; антигенные свойства проверяют в реакции агглютинации. Инактивацию микробных клеток проводят формалином, по окончании процесса инактивированную биомассу высевают на дифференциально-диагностическую питательную среду висмут-сульфитный агар для подтверждения отсутствия роста сальмонелл.

Инактивированную культуральную жидкость подвергают ферментативному гидролизу и сепарированию; из гидролизата ферментативными методами поэтапно выделяют ЛПС, а затем лиофилизируют, получая субстанцию-лиофилизат очищенного ЛПС.

На стадии производства субстанцию испытывают по следующим показателям:

Описание. Порошок светло-кремового цвета. Определение проводят визуально.

Белок. Не более 3 %. Испытания проводят колориметрическим методом по методу Лоури в соответствии с ОФС «Определение белка колориметрическим методом (метод Лоури) в биологических лекарственных препаратах». Приготовление испытуемого образца ЛПС указывается в нормативной документации.

Нуклеиновые кислоты. Не более 5 %. Испытания проводят методом Спирина в соответствии с ОФС «Определение нуклеиновых кислот по методу Спирина в биологических лекарственных препаратах». Приготовление испытуемого образца ЛПС указывается в нормативной документации.

Углеводы. От 40 до 60 %. Испытания проводят с антроновым реактивом в соответствии с ОФС «Определение сахаров спектрофотометрическим методом». Приготовление испытуемого образца ЛПС указывается в нормативной документации.

Безвредность. Препарат должен быть безвредным. Испытания проводят на 5 здоровых белых мышах массой (17 ± 1) г, которым внутрибрюшинно вводят 1 мл раствора ЛПС с концентрацией 100 мкг/мл; срок наблюдения за животными составляет 5 дней. Приготовление испытуемого образца ЛПС указывается в нормативной документации.

Оптическая плотность. Показания оптической плотности раствора липополисахарида при 256 нм не должны превышать 0,300; при 280 нм – не более 0,200. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимых областях». Приготовление испытуемого образца ЛПС указывается в нормативной документации.

Потеря массы при высушивании. Не более 10 %. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Определение минимальной пирогенной дозы (МПД) рабочей серии ЛПС. Одна МПД должна составлять (0,0075 ± 0,0025) мкг ЛПС. Предварительно готовят раствор ЛПС в концентрации 100 мкг/мл, затем путем последовательных десятикратных разведений получают раствор с концентрацией 0,01 мкг/мл и из него – раствор с концентрацией 0,0075 мкг/мл (к 9 мл испытуемого образца с концентрацией 0,01 мкг/мл прибавляют 3 мл 0,9 % раствора натрия хлорида). Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». За 1 ч до опыта у каждого кролика дважды с интервалом не менее 30 мин измеряют ректальную температуру. Различия в показаниях температуры у одного и того же животного не должны превышать 0,2 °С. Животным вво-

дят раствор препарата с концентрацией 0,0075 мкг/мл внутривенно из расчета 1 мл на 1 кг массы тела. Средний показатель повышения температуры должен составлять от 0,6 до 0,8 °С.

В случае, если средний показатель повышения температуры будет ниже 0,6 °С, вводят раствор препарата с концентрацией 0,01 мкг/мл по 1 мл на 1 кг массы животного; если средний показатель повышения температуры будет выше 0,8 °С, вводят раствор препарата с концентрацией 0,005 мкг/мл по 1 мл на 1 кг массы животного. Повторный контроль проводят на том же количестве кроликов. Если при повторном испытании после введения растворов с концентрацией 0,01 или 0,005 мкг/мл средний показатель повышения температуры у животных составит ниже 0,6 °С или выше 0,8 °С соответственно, препарат бракуют. Минимальное количество вещества, вводимого внутривенно, на 1 кг массы кролика, вызывающее среднее повышение температуры тела на 0,6 – 0,8 °С составляет МПД. Одна МПД должна составлять (0,0075 ± 0,0025) мкг ЛПС.

Субстанцию - лиофилизат очищенного ЛПС используют для получения лекарственного препарата пирогенал, суппозитории ректальные.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Суппозитории желтовато-белого цвета однородной консистенции, цилиндрической формы с заостренным концом, диаметром не более 10 мм.

Подлинность. Должен быть пирогенным. Одна МПД должна составлять (0,0075 ± 0,0025) мкг ЛПС (раздел «Специфическая активность»).

Средняя масса и отклонение от средней массы. 1,6 г ± 5 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

Температура и время плавления. Не более 20 мин. Один суппозиторий помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, заливают 50 мл

водой очищенной, подогретой до температуры (37 ± 1) °С и выдерживают в термостате при той же температуре. В течение не более 20 мин суппозиторий должен полностью расплавиться.

Микробиологическая чистота. В 1 суппозитории допускается не более 300 колониеобразующих единиц (КОЕ) микробов-сапрофитов при отсутствии патогенных, условно-патогенных микроорганизмов и грибов. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

Безвредность. Должен быть безвредным. Для испытания отбирают 4 суппозитория. Испытуемые образцы помещают в пробирку вместимостью 20 мл и расплавляют на водяной бане при температуре 40 – 45 °С в течение 15 – 20 мин. Расплавленную массу вводят 5 беспородным белым мышам массой (15 ± 1) г по 1 мл внутрибрюшинно со скоростью 0,1 мл/с шприцем вместимостью 1 $см^3$. В течение 5 сут животные должны оставаться живыми. В случае гибели хотя бы 1 животного опыт повторяют на удвоенном количестве мышей. Если при повторном испытании мыши остались живы, препарат считают прошедшим испытание. В противном случае препарат бракуют.

Специфическая активность. Должен быть пирогенным. При введении 1 МПД на 1 кг массы кролика средний показатель повышения температуры должен составлять 0,6 – 0,8 °С. Для определения специфической активности берут 3 суппозитория. В коническую колбу вместимостью 500 мл наливают 295 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и доводят его до закипания. В раствор опускают 3 суппозитория и ставят колбу на разогретую магнитную мешалку. Экстракцию пирогенала из суппозиториев проводят в течение 60 мин при интенсивном перемешивании, чтобы жировой слой разбивался на мельчайшие капельки, затем содержимое отстаивают в течение 10 – 15 мин. В результате полученный раствор пирогенала считают разведенным в 100 раз, т.е. до 0,5; 1; 1,5; 2 мкг/мл в зависимости от исходного содержания пирогенала в 1 суппозитории. Далее из нижнего слоя раствора делают разведение до 0,0075 мкг/мл. Трем кроликам вводят препарат в концентрации 0,0075 мкг/мл внутривенно из расчета 1 мл на 1 кг массы. Испытание проводят в со-

ответствии с ОФС «Пирогенность». Средний показатель повышения температуры должен составлять 0,6 – 0,8 °С. Если повышение температуры будет ниже 0,6 °С или выше 0,8 °С, то испытуемый образец вводят повторно в концентрации 0,01 или 0,005 мкг/мл. Если при этом средний показатель повышения температуры будет ниже 0,6 °С или выше 0,8 °С, серию бракуют.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С.

Вакцина против коклюша, дифтерии, столбняка и гепатита В адсорбированная, суспензия для внутримышечного введения	ФС.3.3.1.0049.18 Вводится впервые

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину против коклюша, дифтерии, столбняка и гепатита В адсорбированную, суспензию для внутримышечного введения представляющую собой смесь коклюшных бактерий и адсорбированных на алюминия гидроксиде или другом разрешенном к применению минеральном сорбенте дифтерийного и столбнячного анатоксинов и рекомбинантного дрожжевого поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg).

Вакцина предназначена для специфической профилактики коклюша, дифтерии, столбняка и гепатита В.

В состав вакцины может входить консервант.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство вакцины должно осуществляться в соответствии с требованиями ОФС: «Вакцины и анатоксины», «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК».

Производственные штаммы микроорганизмов, используемые при производстве вакцины (*Bordetella pertussis* для получения взвеси коклюшных бактерий, *Clostridium tetani* и *Corynebacterium diphtheriae* для получения анатоксинов столбнячного и дифтерийного, рекомбинантный штамм дрожжей для получе-

ния HBsAg) должны быть полностью охарактеризованными и депонированными в официальной коллекции.

Контроль качества производственных штаммов должен проводиться регулярно, методы определения качества и его периодичность должны быть указаны в нормативной документации.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Опалесцирующая жидкость белого цвета, которая может иметь сероватый или желтоватый оттенок. При отстаивании разделяется на рыхлый осадок белого или белого с сероватым или желтоватым оттенком цвета, легко диспергируемый при встряхивании, и прозрачную надосадочную жидкость. Испытания проводят визуально в проходящем свете.

Подлинность. Вакцина должна обладать специфической (иммуногенной) активностью в отношении каждого из компонентов. Определение проводят методами, изложенными в разделе «Специфическая активность». В нормативной документации могут быть указаны альтернативные методы, подтверждающие наличие в лекарственном средстве дифтерийного и столбнячного анатоксинов, антигенов коклюшных бактерий, а также поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg).

Механические включения. Вакцина должна соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

Проходимость через иглу. Гомогенная взвесь, диспергированная путем встряхивания, должна свободно проходить в шприц через иглу 0,8·40. Определение проводят в соответствии с ОФС «Суспензии».

Время седиментационной устойчивости. После встряхивания и получения гомогенной взвеси не должно наблюдаться полного расслаивания в течение не менее 1 мин, если нет других указаний в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Инъекционные лекарственные формы. Лекарственные средства для парентерального применения».

pH. От 6,8 до 7,4. Испытания проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Стерильность. Вакцина должна быть стерильной. Испытание проводят методом прямого посева в соответствии с ОФС «Стерильность».

Аномальная токсичность. Вакцина должна быть нетоксичной. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Пяти белым мышам препарат вводят внутрибрюшинно по 0,5 мл, двум морским свинкам – подкожно по 3,0 мл (по 1,5 мл в оба бока). За животными наблюдают 7 сут. В течение указанного времени не должно наблюдаться гибели животных и потери массы тела.

Специфическая безопасность. Вакцина должна быть безопасной (дифтерийный и столбнячный компоненты) при подкожном введении 5 морским свинкам массой 250–350 г шести прививочных доз для человека (суммарно в бок и лапку). Через 30 дней все животные должны остаться живыми без симптомов столбняка, дифтерийной интоксикации и потери массы тела. В случае гибели одного из животных или потери массы тела от неспецифических причин испытание повторяют. Если при повторном испытании гибнет более одного животного, лекарственный препарат признают не соответствующим требованиям.

Специфическую безопасность коклюшного компонента оценивают аналогично методу, описанному для определения специфической безопасности коклюшной суспензии.

Специфическая (иммуногенная) активность. Специфическая активность 1 мл вакцины должна быть не ниже 8 международных единиц (МЕ) для коклюшного (нижний предел значения доверительного интервала (P=0,95) не менее 4 МЕ/мл), 60 МЕ для дифтерийного и 120 МЕ для столбнячного компо-

нентов. Специфическую активность HBsAg определяют в тесте *in vivo* на мышах, или по содержанию данного антигена: отношение дозы препарата, вызывающей выработку антител у 50 % мышей ($ЕД_{50}$) препарата сравнения, к $ЕД_{50}$ вакцины должно быть не менее 0,5, содержание HBsAg должно быть не менее 80 % по отношению к препарату сравнения. В качестве препарата сравнения используют референс-вакцину фирмы-производителя, иммуногенная активность которой была подтверждена в тестах in vivo.

Специфическую активность дифтерийного и столбнячного анатоксинов, входящих в состав вакцины, определяют по устойчивости иммунизированных животных к заражению соответствующими токсинами в соответствии с ОФС «Иммуногенность адсорбированного дифтерийного анатоксина» и ОФС «Иммуногенность адсорбированного столбнячного анатоксина». Специфическую активность коклюшного компонента вакцины определяют на модели экспериментального менингоэнцефалита при внутримозговом введении иммунизированным мышам заражающей дозы тест-штамма *B.pertussis* в соответствии с ОФС «Иммуногенность коклюшной суспензии и цельноклеточного коклюшного компонента комбинированных вакцин».

Испытания специфической активности HBsAg проводят в соответствии с ФС «Вакцина гепатита В рекомбинантная».

Полнота сорбции. В 1 мл надосадочной жидкости вакцины не должно содержаться более 1 Lf для неадсорбированного дифтерийного анатоксина, 0,1 ЕС/Lf неадсорбированного столбнячного анатоксина и 20 нг неадсорбированного HBsAg, если в нормативной документации нет иных указаний. Полноту сорбции определяют путем индикации неадсорбированных дифтерийного и столбнячного анатоксинов и HBsAg в надосадочной жидкости вакцины. Определение содержания неадсорбированного дифтерийного анатоксина проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания анатоксинов/токсинов в реакции флокуляции», неадсорбированного столбнячного анатоксина – в соответствии с ОФС «Определение содержания анатоксинов в реакции антитоксинсвязывания». Количество несвязанного HBsAg определяют с помощью иммуно-

ферментного анализа с использованием соответствующих тест-систем с чувствительностью не более 0,1 МЕ/мл в соответствии с ФС «Вакцина гепатита В рекомбинантная».

Формальдегид. Не более 100 мкг/мл. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение формальдегида в биологических лекарственных препаратах» Метод А.

Консерванты (при наличии). Тиомерсал. Концентрация антимикробных консервантов должна быть не ниже минимально эффективной и не превышать указанного на этикетке значения более чем на 15 %. Определение проводят колориметрическим или атомно-абсорбционным методом в соответствии с ОФС «Количественное определение тиомерсала в биологических лекарственных препаратах». Не рекомендуется использование консервантов при производстве лекарственных препаратов, выпускаемых в однодозовой расфасовке.

Сорбенты. Алюминия гидроксид. Не более 1,1 мг/мл алюминия (III), если в нормативной документации нет иных указаний. Определение проводят комплексонометрическим методом в соответствии с ОФС «Определение ионов алюминия в сорбированных биологических лекарственных препаратах».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств», ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. В соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств» и ОФС «Хранение лекарственных средств» при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.

Вакцина комбинированная против гепатита В и анатоксина дифтерийно-столбнячного с уменьшенным содержанием антигенов адсорбированная, суспензия для внутримышечного введения	ФС.3.3.1.0050.18 Вводится впервые

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину комбинированную гепатита В и анатоксина дифтерийно-столбнячного с уменьшенным содержанием антигенов адсорбированную, суспензию для внутримышечного введения представляющую собой смесь адсорбированных на алюминия гидроксиде дифтерийного и столбнячного анатоксинов, и поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg).

Вакцина предназначена для специфической профилактики дифтерии, столбняка и гепатита В.

В состав вакцины может входить консервант.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство вакцины должно осуществляться в соответствии с требованиями ОФС: «Вакцины и анатоксины», «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК».

Производственные штаммы-продуценты столбнячного и дифтерийного экзотоксинов - *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae* и рекомбинантный штамм дрожжей, продуцирующий HBsAg, должны быть полностью охарактеризованы и депонированы в официальной коллекции.

Контроль качества производственных штаммов должен проводиться регулярно, методы определения качества и его периодичность должны быть указаны в нормативной документации.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Опалесцирующая жидкость белого цвета, которая может иметь сероватый или желтоватый оттенок. При отстаивании разделяется на рыхлый осадок белого или белого с сероватым или желтоватым оттенком цвета, легко диспергирующийся при встряхивании, и прозрачную бесцветную надосадочную жидкость. Испытания проводят визуально в проходящем свете.

Подлинность. Вакцина должна обладать специфической (иммуногенной) активностью в отношении каждого из компонентов. Определение проводят методами, изложенными в разделе «Специфическая активность». В нормативной документации могут быть указаны альтернативные методы, подтверждающие наличие дифтерийного и столбнячного анатоксинов, а также HBsAg.

Механические включения. Вакцина должна соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

Проходимость через иглу. Гомогенная взвесь, диспергированная путем встряхивания, должна свободно проходить в шприц через иглу 0,8·40, если нет иных указаний в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Суспензии».

Время седиментационной устойчивости. После встряхивания и получения гомогенной взвеси не должно наблюдаться полного расслаивания в течение не менее 1 мин, если нет других указаний в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Инъекционные лекарственные формы. Лекарственные средства для парентерального применения».

pH. От 6,4 до 7,3. Испытания проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Стерильность. Вакцина должна быть стерильной. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Стерильность». Для посева используют тиогликолевую среду.

Аномальная токсичность. Вакцина должна быть нетоксичной. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Пяти белым мышам препарат вводят внутрибрюшинно по 1 мл, двум морским свинкам – подкожно по 5,0 мл (по 2,5 мл в оба бока). За животными наблюдают 7 сут. В течение указанного времени не должно наблюдаться гибели животных и потери массы тела.

Специфическая безопасность. Вакцина должна быть безопасной при подкожном введении 5 морским свинкам массой 250–350 г 10 прививочных доз для человека (по 2,5 мл в бок и бедро). Через 30 дней все животные должны остаться живыми, без симптомов столбняка и потери массы тела. В случае гибели одного животного или потери массы тела хотя бы одним из животных от неспецифических причин испытание повторяют. Если при повторном испытании гибнет более одного животного, препарат считают не соответствующим требованиям.

Специфическая (иммуногенная) активность. Вакцина должна обладать иммуногенной активностью, обеспечивая выживаемость 100 % иммуни-

зированных животных при заражении летальной дозой дифтерийного токсина и не менее 70 % иммунизированных животных при заражении летальной дозой столбнячного токсина. Специфическую активность HBsAg определяют в тесте *in vivo* на мышах, или по содержанию данного антигена: отношение дозы препарата, вызывающей выработку антител у 50 % мышей ($ЕД_{50)}$ препарата сравнения, к $ЕД_{50}$ вакцины должно быть не менее 0,5, содержание HBsAg должно быть не менее 80 % по отношению к препарату сравнения. В качестве препарата сравнения используют референс-вакцину фирмы- производителя, иммуногенная активность которой была подтверждена в тестах *in vivo*.

Испытание иммуногенности дифтерийного анатоксина. Неразведенный препарат вводят 4 морским свинкам массой 250–350 г однократно под кожу бока в дозе 0,6 мл, что соответствует (6,0±0,3) Lf дифтерийного анатоксина. Через 30 сут определяют резистентность иммунизированных свинок к дифтерийному токсину, который вводят животным в дозе не менее 100 Dlm (минимальная летальная доза) подкожно в бок в объеме 1 мл. За животными наблюдают 5 сут, в течение которых все морские свинки должны остаться живыми. Испытание сопровождают контролем 1 Dlm дифтерийного токсина на 3 морских свинках из той же партии. Контрольные животные (не менее 2) должны погибнуть в течение 4 сут.

Испытание иммуногенности столбнячного анатоксина. Препарат разводят стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида до 4,0 ЕС/мл и вводят группе из 10 белых мышей с массой тела 16–18 г подкожно, в область внутренней поверхности верхней трети бедра, в дозе (2,0±0,1) ЕС в объеме 0,5 мл. Через 21 сут определяют резистентность иммунизированных мышей к столбнячному токсину, который вводят животным в дозе не менее 50 Dlm под кожу внутренней поверхности верхней трети бедра в объеме 0,5 мл. За животными наблюдают в течение 5 сут. Препарат считают выдержавшим испытание, если не менее 7 мышей останутся живыми без явлений столбняка. Опыт сопровождают контролем 1 Dlm столбнячного токсина на 4 мышах

из той же партии. Контрольные животные (не менее 2) должны погибнуть в течение 4 сут.

Испытания специфической активности HBsAg проводят в соответствии с ФС «Вакцина гепатита В рекомбинантная».

Полнота сорбции. В 1 мл надосадочной жидкости вакцины не должно содержаться более 1 Lf неадсорбированного дифтерийного анатоксина, 0,1 ЕС/Lf неадсорбированного столбнячного анатоксина и 20 нг неадсорбированного HBsAg, если в нормативной документации нет иных указаний. Полноту сорбции определяют путем индикации неадсорбированных дифтерийного и столбнячного анатоксинов и HBsAg в надосадочной жидкости вакцины. Определение содержания неадсорбированного дифтерийного анатоксина проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания анатоксинов/токсинов в реакции флокуляции», неадсорбированного столбнячного анатоксина – в соответствии с ОФС «Определение содержания анатоксинов в реакции антитоксинсвязывания». Количество несвязанного HBsAg определяют с помощью иммуноферментного анализа с использованием соответствующих тест-систем с чувствительностью не более 0,1 МЕ/мл в соответствии с ФС «Вакцина гепатита В рекомбинантная».

Формальдегид. Не более 100 мкг/мл. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение формальдегида в биологических лекарственных препаратах» Метод А.

Консерванты. Тиомерсал. Концентрация консерванта не должна быть ниже минимально эффективной и не должна превышать указанную на упаковке более чем на 15 % . Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение тиомерсала в биологических лекарственных препаратах». Не рекомендуется использование консервантов при производстве лекарственных препаратов, выпускаемых в однодозовой расфасовке.

Сорбенты. Алюминия гидроксид. Не более 1,1 мг/мл алюминия (III), если в нормативной документации нет иных указаний. Определение проводят комплексонометрическим методом в соответствии с ОФС «Определение

ионов алюминия в сорбированных биологических лекарственных препаратах».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств», ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. В соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств» и ОФС «Хранение лекарственных средств» при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.

Вакцина герпетическая культуральная инактивированная, лиофилизат для приготовления раствора для внутрикожного введения	ФС.3.3.1.0051.18 Взамен ФС 42-3400-97

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину герпетическую культуральную инактивированную, лиофилизат для приготовления раствора для внутрикожного введения. Препарат содержит взвесь инактивированных формальдегидом вирусов простого герпеса типа 1 и типа 2 (ВПГ-1; ВПГ-2), полученных путем репродукции в культуре перевиваемых клеток почек африканской зеленой мартышки (*VERO B*), и лиофилизированных в сахарозо-желатозной среде. Действующим веществом препарата являются специфические антигены вирусов простого герпеса 1 и 2 типов, стимулирующие клеточные механизмы резистентности организма человека.

Вакцина предназначена для профилактики рецидивов герпетической инфекции, вызванной вирусами герпеса типа 1 и типа 2.

Вакцина содержит инактиватор, стабилизаторы и антибиотик.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство вакцины герпетической культуральной инактивированной (далее вакцины герпетической) должно осуществляться в соответствии с требованиями ОФС: «Вакцины и анатоксины», «Требования к клеточным культурам-субстратам производства в биологических лекарственных препаратов», «Вирусная безопасность», «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Производственные штаммы ВПГ-1 («УС») и ВПГ-2 («ВН»), используемые в производстве и контроле вакцины должны быть охарактеризованы и депонированы в официальной Государственной коллекции микроорганизмов.

Контроль качества производственных штаммов должен проводиться регулярно, методы определения их качества и периодичность должны быть указаны в нормативной документации.

В процессе производства жидких моновалентных субстанций вакцины до введения стабилизаторов проводят контроли по показателям «Специфическая безопасность», «Общий белок», «Формальдегид», «Герметизация».

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Аморфная масса от светло-желтого до розового цвета, обладающая гигроскопичностью. Испытание проводят визуально.

Восстановленный препарат - опалесцирующая жидкость от розового до розового с желтым оттенком цвета. Испытание проводят визуально.

Подлинность. Должен вызывать образование вируснейтрализующих антител к ВПГ - 1 и ВПГ -2 при иммунизации белых крыс. Определение проводят биологическим методом, по разделу «Специфическая активность».

Время растворения. Не более 1 мин. Определение проводят в соответствии с ОФС «Растворимость».

pH восстановленного препарата. От 6,5 до 7,8. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Механические включения. Должен соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

Потеря в массе при высушивании. Не более 2,5 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Стерильность. Должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Присутствие микоплазм. Не должен содержать микоплазм. Определение проводят микробиологическим методом в соответствии с ОФС «Испытание на присутствие микоплазм».

Бактериальные эндотоксины. Не более 25 ЕЭ/мл. Определение проводят методом гель-тромб тест в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

Формальдегид. Не более 200 мкг/мл. Определение проводят колориметрическим методом в соответствии с ОФС «Количественное определение формальдегида в биологических лекарственных препаратах».

Аномальная токсичность. Должен быть нетоксичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Тест-доза - 1 доза вакцины вводится морским свинкам подкожно, белым мышам – внутрибрюшинно.

Бычий сывороточный альбумин (БСА). Не более 0,5 мкг/мл. Определение проводят методом ракетного иммуноэлектрофореза в соответствии с ОФС «Определение бычьего сывороточного альбумина в биологических лекарственных препаратах методом ракетного иммуноэлектрофореза» или другим валидированным методом, указанным в нормативной документации.

Содержание гентамицина сульфата. Не более 40 мкг/мл. Определение проводят методом диффузии в агар в соответствии с ОФС «Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар».

Остаточная ДНК культуры клеток *VERO B*. Не более 100 пкг/мл. Определение проводят методом полимеразной цепной реакции. Принцип метода изложен в ОФС «Полимеразная цепная реакция» методика должна быть, указана в нормативной документации.

Специфическая безопасность. Не должна содержать живых ВПГ - 1 и ВПГ -2. Определение проводят биологическим методом по выявлению цитопатического действия (ЦПД) на культуре клеток *VERO B* и на 12 - 14-дневных беспородных белых мышах

Испытание проводят с деформалинизированными субстанциями.

Определение ЦПД на культуре клеток *VERO B* в двух пассажах. В 4 матраса емкостью 250 мл вносят по 25 мл культуры клеток *VERO B* (посевная концентрация 100 000 клеток в 1 мл ростовой среды Игла с добавлением 8 % эмбриональной телячьей сыворотки), инкубируют до образования монослоя при температуре 37 ºС в течение 24 - 48 ч. Затем сливают ростовую среду и дважды промывают раствором Хэнкса (40 -50 мл на промывку одного матраса). Раствор сливают.

Проведение первого пассажа. В два матраса вносят испытуемый образец по 10 % от объема среды, в оставшиеся два матраса - ростовую среду Игла с добавлением 8 % эмбриональной телячьей сыворотки. Матрасы инкубируют при температуре 37 ºС в течение 5 сут, с ежедневным микроскопированием с целью выявления возможного ЦПД. Затем матрасы с содержимым подвергают однократному замораживанию при температуре -20 ºС оттаиванию при комнатной температуре, затем выдерживают при температуре 6- 8 ºС в течение 20 - 24 ч. Образовавшиеся надосадочные жидкости из матрасов сливают и объединяют в трех отдельных емкостях, по одной на каждый штамм ВПГ -1, ВПГ -2 и контроль.

Проведение второго пассажа. Из каждой емкости с объединенным материалом первого пассажа отбирают пробу по 10 % от объема ростовой среды и проводят второй пассаж при тех же условиях.

Учет результатов проводят путем микроскопии монослоя клеток (окуляр ×10, объектив ×20). В контрольных пробах клетки *VERO B* должны образовывать монослой, иметь прозрачную цитоплазму, дифференцированные ядра и четко выраженные признаки контактной ингибиции. Клеточный монослой в матрасах с испытуемыми пробами 1 и 2 пассажей не должен отличаться от монослоя в контроле.

Определение ЦПД проводят на белых мышах массой 8-10 г.

Первый пассаж. После замораживания, оттаивания и осаждения монослоя клеток, отделяют надосадочную культуральную жидкость и по 0,03 мл вводят интрацеребрально 10-ти животным опытной группы.

Десяти мышам контрольной группы интрацеребрально вводят по 0,03 мл ростовой среды Игла с 8 % эмбриональной телячьей сыворотки.

Второй пассаж. Из опытной и контрольной групп забивают по пять мышей. Из мозга мышей каждой группы готовят 10 % суспензии на среде Игла с 8 % эмбриональной телячьей сыворотки, которые вводят интарцеребрально мышам опытной и контрольной групп, соответственно (по 10 животных в каждой).

Учет результатов. В опытной и контрольной группах, при первом и втором пассажах не должно наблюдаться заболевания и/или гибели ни одной мыши. Гибель животных, наступившую в течение первых трех сут после заражения, считают травматической и не учитывают. В случае если, заболевание и/или гибель мышей выявляется в период наблюдения свыше 3 сут, проводят повторный контроль на удвоенном количестве животных. При повторном выявлении заболевания и/или гибели мышей серию субстанции бракуют.

Примечания

Приготовление деформалинизировнанной субстанции вакцины. На каждые 100 мл инактивированной формальдегидом вируссодержащей культуральной жидкости добавляют по 2,2 мл 2,2 % раствора натрия пиросернистокислого.

Приготовление 2,2 % раствора натрия пиросернистокислого. В мерной колбе вместимостью 25 мл в воде очищенной растворяют 0,55 г натрия пиросернистокислого, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Полученный раствор стерилизуют автоклавированием при температуре 120 – 122 °С под давлением 110 кПа в течение 40-43 мин. Раствор хранят при комнатной температуре не более 2 сут.

Специфическая активность (иммуногенность). Показатель индекса нейтрализации не менее 2,0 lg для штамма «УС» (ВПГ - 1) и не менее 1,5 lg для штамма «ВН» (ВПГ - 2). Определение проводят биологическим методом в реакции нейтрализации (РН) с иммунными сыворотками крыс на культуре клеток *VERO B.* Методика определения должна быть указана в нормативной документации.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств», ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. В соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств» и «Хранение лекарственных средств» при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре от 9 до 18 °С не более трех сут. Замораживание не допускается.

Вакцина Ку-лихорадки М-44 живая, лиофилизат для приготовления суспензии для накожного скарификационного нанесения	ФС.3.3.1.0052.18 Взамен ФС 42-3675-98

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину Ку-лихорадки М-44 живую, лиофилизат для приготовления суспензии для накожного скарификационного нанесения. Препарат представляет собой взвесь живой культуры аттенуированного вакцинного штамма М-44 коксиелл Бернета (*Coxiella burnetii)*, выращенной в желточных мешках развивающихся куриных эмбрионов (РКЭ), лиофилизированную в стерильной сахарозо-молочной смеси.

Вакцина предназначена для специфической профилактики Ку-лихорадки.

Вакцина выпускается в комплекте с растворителем (0,9 % раствор натрия хлорида) не содержит консервантов и антибиотиков.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство вакцины Ку-лихорадки М-44 должно осуществляться в соответствии с ОФС «Вакцины и анатоксины».

Производственный вакцинный штамм М-44 и тест-штамм для контроля вакцины должны быть аттестованы и депонированы в официальной коллекции микроорганизмов.

Производственный вакцинный штамм и штамм для контроля вакцины, по мере использования, но не реже 1 раза в 5 лет, получают сублимацией с последующей запайкой ампул в вакууме и хранят при температуре не выше минус 40-50 ^{0}С в соответствии с установленными правилами порядка учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности.

Качество производственных штаммов и периодичность контроля должны быть указаны в нормативной документации.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Аморфная масса в виде таблетки розового цвета с сероватым, желтоватым или коричневатым оттенком. Определение проводят визуально.

Восстановленная вакцина представляет собой густую гомогенную суспензию розового цвета с сероватым, желтоватым или коричневатым оттенком. Определение проводят визуально.

Подлинность. Должна вызывать специфический иммунитет к коксиеллам Бернета при иммунизации морских свинок, обладать инфекционностью и характерными морфологическими свойствами при культивировании коксиелл в РКЭ. Определение проводят в соответствии с разделом «Специфическая активность».

Время восстановления препарата. Должна восстанавливаться в течение 2 мин при добавлении в ампулу 0,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, используемого в качестве растворителя для приготовления лекарственных форм для инъекций. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Время седиментационной устойчивости. Суспензия вакцины после встряхивания не должна расслаиваться в течение не менее 5 мин. Определение

проводят в соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

Проходимость через иглу. Гомогенная взвесь, диспергированная путем встряхивания, должна свободно проходить в шприц через иглу 0,8·40, если нет иных указаний в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Суспензии».

Потеря в массе при высушивании. Не более 3,0 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение потери в массе при высушивании».

Стерильность. Не должна быть контаминирована посторонней микрофлорой. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Аномальная токсичность. Должна быть нетоксичной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

Содержимое 1 ампулы растворяют в 5,0 мл 0,9 % раствора натрия хлорида для инъекций и вводят по 0,5 мл каждому животному: 5 мышам массой 17-20 г. внутрибрюшинно и 2 морским свинкам массой 250-300 г подкожно. Период наблюдения за животными составляет 7 сут.

Специфическая безопасность. Должна быть безопасной. Определение проводят биологическим методом на 18 морских свинках массой 350-400 г без учета пола, которым подкожно в объеме 1,0 мл вводят образцы препарата в дозах, содержащихся в разведениях 10^{-5}, 10^{-6} и 10^{-7}. Одновременно должна быть сформирована контрольная группа из 18 интактных морских свинок той же весовой категории без учета пола и для последующего их использования в качестве контрольной группы при испытании вакцины по показателю «Специфическая активность. Иммуногенность». Предварительно, до иммунизации, проводят термометрию животных. В опыте используются морские свинки, ректальная температура которых в течение предшествующих 3 сут не превышала 39,5 ^{o}C.

Для иммунизации животных используют две ампулы вакцины. Содержимое каждой ампулы восстанавливают в 2,5 мл стерильного фосфатного забуференного физиологического раствора pH (7,0±0,2), после чего содержимое ампул

объединяют, получая при этом разведение $^{-}10^{-1}$ (учитывается доза розлива вакцины 0,5 мл и её исходное разведение по возбудителю в среде высушивания 1:2). Далее методом последовательных десятикратных разведений с 10^{-2} до 10^{-7} проводят разведение вакцины, соблюдая правила асептики. Каждой дозой вакцины в рабочих разведениях от 10^{-5} до 10^{-7} вакцинируют по 6 морских свинок подкожно в левую паховую область в объёме 1,0 мл. Наблюдение за иммунизированными животными (температурная и местная реакция) проводят в течение 15 сут после вакцинации. У животных, вакцинированных вакциной в разведениях 10^{-6} и 10^{-7}, не должно быть циклически протекающей лихорадки (повышение ректальной температуры выше 39,5 ^{o} С) и местной реакции в виде геморрагического воспаления. Допускается подъём температуры выше 39,5 ^{o} С в течение 1-2 сут и инфильтрат в месте введения не более 10 мм в диаметре не более чем у 2 морских свинок, вакцинированных аттенуированным штаммом М-44 коксиелл Бернета в разведении 10^{-5}.

Примечание

Приготовление фосфатного забуференного физиологического раствора pH (6.8-7.2). В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносят 0,56 г динатрия гидрофосфата (предварительно высушенного), 0,08 г калия дигидрофосфата, 8,3 г натрия хлорида и растворяют в воде, доводят объем раствора тем же растворителем до метки, перемешивают и проводят измерение pH потенциометрически. При необходимости, проводят корректировку pH до 6,8-7,2 насыщенными растворами солей динатрия гидрофосфата или калия дигидрофосфата. Полученный раствор стерилизуют при избыточном давлении пара 0,1 МПа, температуре 120-122 ^{0}С в течение 15 мин однократно. Приготовленный раствор хранят при температуре 2-8 ^{0}С не более 1 мес.

После завершения испытания на специфическую безопасность иммунизированных морских свинок и контрольную группу животных используют для испытания вакцины по показателю «Специфическая активность. Иммуногенность».

Специфическая активность. Определяется по иммуногенности и минимальной инфицирующей дозе для куриных эмбрионов (МИДэ).

Иммуногенность. Вакцина должна быть иммуногенной. Определение проводят на группах морских свинок, ранее иммунизированных вакциной в

разведениях 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, после завершения испытаний специфической безопасности. Напряженность иммунитета у животных проверяют через 45-55 сут после иммунизации путем введения вирулентной культуры штамма Грита коксиелл Бернета, содержащей не менее 10000 инфицирующих доз возбудителя, что соответствует разведению 10^{-5} вирулентной культуры, используемой непосредственно из лиофилизированного состояния (при ИД равной разведению 10^{-9}). Такой же дозой вирулентной культуры одновременно заражают 6 морских свинок из контрольной группы. Для подтверждения правильности использования величины заражающей дозы другой группе контрольных животных вводят культуру коксиелл штамма Грита в разведениях 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10} (по 4 морских свинки на каждое разведение)

Оценку иммунитета у иммунизированных вакциной животных проводят на основании наблюдения за температурной реакцией в течение 19 сут после заражения и результатов вскрытия, проводимого по истечении этого срока, для определения характера и выраженности местной реакции. У иммунизированных морских свинок введение вирулентной культуры не должно вызвать развития заболевания в связи с приобретением специфического иммунитета.

У всех контрольных животных, зараженных вирулентной культурой в разведении 10^{-5}, должно развиться заболевание, характеризующееся лихорадочной реакцией продолжительностью не менее 4 сут и резко выраженной местной реакцией.

При ИД, равной разведению 10^{-9}, хотя бы у одного контрольного животного, зараженного вирулентной культурой в этом разведении, должна развиться укороченная лихорадка до 3 сут и местная реакция в виде точечных кровоизлияний в мышцы.

МИДэ (минимальная инфицирующая доза для куриных эмбрионов). Должна соответствовать разведению вакцины 10^{-9} – 10^{-11} (от $5 \cdot 10^{7}$ до $5 \cdot 10^{9}$ МИДэ в 1 прививочной дозе (0,05 мл)). Определяют биологическим и бактериоскопическим методом.

Определение проводят на 6-7 суточных РКЭ со скорлупой белого цвета. Для испытания используют 2 ампулы с вакциной, восстановленной в 5 мл фосфатного забуференного физиологического раствора pH (7,0±0,2). Полученная суспензия содержит живой компонент вакцины в разведении 10^{-1} (учитывается доза розлива вакцины 0,5 мл и её исходное разведение по возбудителю в среде высушивания 1:2). Далее готовят ряд последовательных десятикратных разведений вакцины от 10^{-2} до 10^{-11}. Разведения вакцины 10^{-7}-10^{-11}, являющиеся рабочими для данного испытания, вводят в полость желточного мешка РКЭ в объеме 0,5 мл. На каждое разведение вакцины используют по 10 куриных эмбрионов, которые после введения вакцины инкубируют при температуре 35-37 ^{o}C и относительной влажности воздуха 40-60 % в течение 13 сут. Эмбрионы, погибшие с 5 по 13 сут, вскрывают в день гибели, оставшиеся живыми – на 13 сут. С помощью стерильных анатомических пинцетов из каждого эмбриона извлекают кусочек оболочки желточного мешка, который после промывания в фосфатном забуференном физиологическом растворе (pH 7,0±0,2) тщательно растирают на хорошо обезжиренном предметном стекле. Мазки высушивают на воздухе, фиксируют смесью Никифорова, состоящей из равных объемов спирта этилового и эфира диэтилового и окрашивают по методу Романовского-Гимзы.

Примечания

Окраска по методу Романовского-Гимзы.

Приготовление фосфатно-буферного раствора (ФБС): ФБС готовят в соответствии с инструкцией по применению красителя Азур – Эозин по Романовскому (в растворе). Для приготовления ФБС допускается использование готовых наборов «Фосфатный буфер» с pH 6,8 – 7,2. Полученный раствор используют для разведения красителя и промывки стекол. Фосфатный буферный раствор хранят в плотно закрытом флаконе при температуре 2 – 8 ^{0}C в течение 3 мес, при комнатной температуре - не более 1 мес.

Приготовление рабочего раствора красителя. Смешивают краситель Азур - Эозин с буферным раствором в соотношении 1:5 - 1:10 и фильтруют через двойной бумажный фильтр. Степень разбавления красителя устанавливают опытным путем. Рабочий раствор красителя готовят непосредственно перед окраской мазков, хранят при комнатной температуре в течение 6 - 8 ч.

Краситель Азур-Эозин по Романовскому (сухой). При отсутствии готового красителя Азур – Эозин по Романовскому в растворе, допускается приготовление раствора красителя из Азур - Эозин по Романовскому сухого (далее -

красящая смесь): раствор красителя готовят из расчета 800 мг на 100 мл растворителя. Берут навески красящей смеси массой 300 мг и 500 мг. Навеску массой 300 мг помещают в фарфоровую ступку и добавляют 100 мл растворителя (смесь равных объемов спирта этилового 100 % и глицерина). Растирают навеску с растворителем и далее, помешивая, добавляют навеску красящей смеси массой 500 мг до получения однородной смеси. Приготовленный раствор красителя хранят в сухом прохладном месте в плотно закрытом сосуде темного стекла в течение 1 мес.

Приготовление рабочего раствора красителя: к 1 мл раствора красителя добавляют 2 мл основного буферного раствора, 47 мл воды очищенной и перемешивают. Рабочий раствор красителя хранят при комнатной температуре в течение 6 - 8 ч.

Фиксированные мазки окрашивают согласно инструкции по применению красителя Азур – Эозин по Романовскому (в растворе). Время окраски составляет 20-40 минут (устанавливается опытным путем). По окончании окрашивания мазки промываются фосфатным буферным раствором (pH 6,8 – 7,2). Допускается использование для промывки препаратов водопроводной воды, воды очищенной с pH 6,8 ±0,3 (при этом необходимо избегать длительного контакта препарата с водой).

В мазках из оболочек желточных мешков куриных эмбрионов, зараженных разведениями вакцины 10^{-7} - 10^{-8}, коксиеллы должны обнаруживаться микроскопически. В мазках из оболочек желточных мешков куриных эмбрионов, зараженных разведениями вакцины 10^{-9}-10^{-11}, можно не получить микроскопически подтверждаемого накопления коксиелл. В этом случае необходимо проведение субпассажа.

Приготовленные мазки просматривают в световом биологическом микроскопе (масляные иммерсионные объективы 90х (1,25), 100х (1,3) и окуляры 7х и 10х). Коксиеллы должны иметь фиолетовую окраску и быть представлены преимущественно мелкими кокковидными формами «a», допускается наличие палочковидных форм «b» и нитевидных форм «d». Учет проводят на основании оценки накопления коксиелл по условной «трехкрестной» системе.*

**За МИДэ принимают наибольшее разведение вакцины, которое в пассаже (или субпассаже) вызывает микроскопически подтверждаемое накопление коксиелл* («+») *хотя бы у одного из зараженных эмбрионов (КЭ)*.*

Оценку количества коксиелл проводят по условной «трехкрестной» системе (микроскопирование мазков из желточных мешков РКЭ, окрашенных по Романовскому –Гимза):

«+» - единичные коксиеллы хотя бы в одном поле зрения микроскопа;

«++» - 20-50 коксиелл в поле зрения;

«+++» - неподсчитываемое количество коксиелл в поле зрения.

Расчет в 1 прививочной дозе: 1,0 мл вакцины должен содержать 10^{9} - 10^{11} МИДэ; 0,05 мл вакцины 1 прививочной дозы - соответственно $5 \cdot 10^{7}$ – $5 \cdot 10^{9}$ МИДэ.

Растворители, выпускаемые в комплекте с препаратом. Стерильный 0,9 % раствор натрия хлорида – растворитель, используемый для приготовления лекарственных форм для инъекций. Требования к качеству растворителя должны быть установлены в нормативной документации.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств», ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. В соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств» и ОФС «Хранение лекарственных средств» при температуре от 2 до 8^{o} С. Замораживание не допускается.

Вакцина БЦЖ для иммунотерапии рака мочевого пузыря живая	ФС.3.3.1.0053.18 Взамен ВФС 42-3001-97

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину БЦЖ для иммунотерапии рака мочевого пузыря, живую. Препарат представляет собой микобактерии вакцинного штамма *Mycobacterium bovis*, субштамм *BCG-1* (Russia), лиофилизированные в 1 ,5 % растворе стабилизатора – натрия глутамата моногидрат.

Вакцина являясь неспецифическим иммуномодулятором БЦЖ, местно повышает активность макрофагов, продукцию цитокинов, включая интерлейкин-1 (ИЛ-1), интерлейкин-2 (ИЛ-2), интерлейкин-6 (ИЛ-6), интерферон-гамма и фактор некроза опухоли - альфа. Повышение продукции цитокинов стимулирует активность естественных киллеров. Вызванный БЦЖ иммунный ответ с активацией Т-лимфоцитов оказывает противоопухолевое действие.

Препарат предназначен для иммунотерапии поверхностного (T_a, T_1, T_{is}) рака мочевого пузыря или профилактики его рецидивов после трансуретрального удаления опухолей.

ПРОИЗВОДСТВО

Технологический процесс производства должен обеспечивать стабильное получение вакцины. Все этапы производства препарата должны осу-

ществляться с соблюдением установленных требований организации производства и контроля качества лекарственного препарата, гарантирующих качество и безопасность для человека. Работа должна проводиться в помещениях, оборудованных автономной приточно-вытяжной вентиляцией. Питательные среды перед посевом микобактерий должны быть проверены на стерильность в соответствии с ОФС «Стерильность».

На всех стадиях производства и хранения вакцины следует обеспечивать защиту от прямого воздействия света и ультрафиолетового излучения.

Производство вакцины основано на системе посевного материала. Посевной материал (серия) – лиофилизат субштамма *M. bovis BCG-1*(Russia) из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов. Очередная посевная серия вакцинного штамма БЦЖ-1 должна быть изготовлена из наиболее ранней серии (первичной или вторичной посевной серии). Информация о происхождении и последующих действиях со штаммом содержится в архивных данных, которые используют для идентификации штамма посевного материала. Посевной материал (серия) должен быть идентифицирован как *M.bovis*, субштамм *BCG-1* (Russia) микробиологическими методами и подходящим молекулярно-биологическим методом, указанным в нормативной документации.

Посевную серию готовят в объеме, обеспечивающем производство вакцины в течение не менее 10 лет, и хранят при температуре не выше минус 18 ^{o}C. Общее число пассажей для приготовления посевной и коммерческой серии не должно превышать 12.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Порошкообразная пористая масса или в виде таблетки светло-желтого цвета, гигроскопична.

Восстановленная вакцина должна иметь вид густой грубодисперсной суспензии белого с сероватым или желтым оттенком цвета без посторонних включений. Определение проводят визуально.

Подлинность. При микроскопии мазков, окрашенных по Цилю-Нильсену, должны определяться окрашенные в красный цвет (кислотоустойчивые) тонкие, прямые или слегка изогнутые палочки длиной 1–4 мкм и шириной 0,3–0,5 мкм, часто с небольшими вздутиями на концах, не образующие спор и капсул.

При посеве вакцины на плотную среду Левенштейна-Йенсена через 28–30 сут инкубации при температуре (37±1) ºС на поверхности среды должны вырастать характерные шероховатые плотные колонии от 0,5 до 8,0 мм в диаметре желтоватого цвета с тонкими неровными краями.

Время восстановления препарата. Не более 5 мин. При добавлении в ампулу (флакон) 0,9 % раствора натрия хлорида для инъекций и экспозиции в течение 3-5 мин с последующим 2-4-кратным перемешиванием должна образоваться грубодисперсная гомогенная суспензии светло желтого цвета. Допускается наличие хлопьев, которые должны разбиваться с помощью шприца или пипетки. Определение проводят визуально в соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Проходимость через иглу. Суспензия должна свободно проходить в шприц через иглу 0,8 · 40, если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Суспензии».

Общее содержание бактерий. Показатель оптической плотности, восстановленной вакцины до содержания 1 мг/мл микробных клеток БЦЖ должен быть в пределах от 0,30 до 0,40. Испытания проводят фотометрическим методом при длине волны (490 ± 3,0) нм в кювете с толщиной слоя 5 мм. В качестве контрольной пробы используют 0,9 % раствор натрия хлорида. Проводят испытания не менее 5 образцов параллельно со стандартным образцом (СО) вакцины БЦЖ по методике, изложенной в нормативной документации.

Дисперсность. Показатель дисперсности должен быть не ниже 1,2. Определение проводят фотометрическим методом (одновременно с опреде-

лением общего содержания бактерий) по методике, изложенной в нормативной документации. Если по результатам анализа не более чем в 1 образце показатель дисперсности ниже 1,2, испытание проводят на 5 дополнительных образцах. При повторном испытании не допускается наличие образцов с показателем дисперсности ниже 1,2.

Потеря в массе при высушивании или Вода. Не более 5,0 %. Испытание проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании» или методом титрования с реактивом К. Фишера в соответствии с ОФС «Определение воды».

Отсутствие посторонней микрофлоры. Посторонняя микрофлора (бактерии, грибы) должна отсутствовать за исключением микобактерий БЦЖ. Определение проводят методом прямого посева в соответствии с ОФС «Стерильность».

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

Специфическая безопасность. Вирулентные микобактерии должны отсутствовать. Испытание проводят на морских свинках одного пола массой от 250 до 350 г, не получающих какое-либо лечение или диету с антибиотиками, способную повлиять на результаты теста (вводимая тест-доза 5 мг вакцины в 1 мл растворителя. Тест проводят на 2 морских свинках в течение 12 недель или на 6 морских свинках в течение 6 недель:

- двум морским свинкам вводят вакцину под кожу внутренней поверхности правого бедра (животные должны оставаться здоровыми);

- шести морским свинкам вводят вакцину подкожно или внутримышечно (при гибели до окончания срока наблюдения одной морской свинки, если у нее нет признаков туберкулезной инфекции, испытания повторяют).

По истечении срока наблюдения животных умерщвляют. При макроскопическом и, при необходимости, микроскопическом исследовании внутренних органов животных не должно быть признаков туберкулезной инфекции. При обнаружении признаков туберкулеза серию бракуют, выпуск

последующих серий вакцины прекращают, а все имеющиеся запасы вакцины хранят до выявления причин случившегося.

Животных, павших до окончания срока наблюдения вскрывают и исследуют, как описано выше. При гибели одной морской свинки без признаков туберкулезной инфекции тест считается завершенным, а препарат – специфически безопасным. При гибели двух животных испытания повторяют.

Специфическая безопасность может быть дополнительно подтверждена путем анализа вакцины БЦЖ молекулярно-биологическим методом, например, с помощью зарегистрированного в РФ набора полимеразной цепной реакции, дифференцирующей *M.bovis* BCG от других представителей M. tuberculosis complex. ДНК других микобактерий кроме *M.bovis* BCG должны отсутствовать. При удовлетворительном результате дополнительного исследования длительность теста «Специфическая безопасность», проводимого на 2 морских свинках, может быть сокращена до 6 недель.

Специфическая активность. Должно быть от 8 до 15 млн жизнеспособных единиц в 1 мг бактериальной массы. Оценивают по показателю жизнеспособности – числу жизнеспособных клеток БЦЖ в 1 мг вакцины. Применяют метод посева вакцины на плотную питательную среду Левенштейн-Йенсена. Посев проводят параллельно с СО или референс-препаратом вакцины туберкулезной БЦЖ.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств» и ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и **хранение.** В соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств», «Хранение лекарственных средств», «Иммунобиологические лекарственные препараты», при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте.

Вакцина Е сыпнотифозная комбинированная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения	ФС.3.3.1.0054.18 Взамен ФС 42-3674-98

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину Е сыпнотифозную комбинированную живую (ЖКСВ-Е), лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения, которая представляет собой взвесь живых риккетсий Провачека (*Rickettsia prowazekii*) аттенуированного (вакцинного) штамма *Е (Мадрид-Е),* выращенных в ткани желточных мешков развивающихся куриных эмбрионов, в комбинации с растворимым антигеном из инактивированных риккетсий Провачека (*R. prowazekii*) вирулентного штамма *Брейнль*, лиофилизированную в стерильном обезжиренном коровьем молоке.

Вакцина предназначена для специфической профилактики сыпного тифа.

В состав препарата входит вспомогательное вещество.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство вакцины ЖКСВ-Е должно осуществляться с соблюдением надлежащих требований к организации производства и контролю качества лекарственных препаратов, гарантирующих качество и безопасность для человека в соответствии с ОФС «Вакцины и анатоксины».

Производственные штаммы должны быть аттестованы и депонированы в официальной коллекции микроорганизмов.

Качество производственных штаммов и периодичность контроля должны быть указаны в нормативной документации.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Пористая масса в виде таблетки от светло-желтого до темно-коричневого цвета. Определение проводят визуально.

Восстановленный препарат представляет собой гомогенную суспензию светло-желтого цвета. Определение проводят визуально.

Подлинность. Должен обладать антигенной активностью, иммуногенностью и минимальной инфицирующей дозой для РКЭ (МИДэ). Определение проводят по разделу «Специфическая активность».

Время восстановления препарата. Не более 2 мин при добавлении в ампулу 5 мл прилагаемого растворителя (стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида) Испытания проводят в соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Седиментационная устойчивость. Суспензия не должна расслаиваться в течение не менее 5 мин. Определение проводят в соответствии с ОФС «Суспезии».

Проходимость через иглу. Восстановленный препарат должен свободно проходить в шприц через иглу 0,8·40. Определение проводят в соответствии с ОФС «Суспензии».

pH. От 5,0 до 7,0. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Потеря в массе при высушивании. Не более 3,0 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение потери в массе при высушивании».

Стерильность. Должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Аномальная токсичность. Должен быть нетоксичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность Содержимое 1 ампулы растворяют в 5 мл прилагаемого растворителя и вводят по 0,25 мл белым мышам массой 17-20г. внутрибрюшинно, морским свинкам массой 250-350г. - подкожно. Период наблюдения за животными составляет 7 сут.

Специфическая безопасность. Должен быть безопасным. Определение проводят биологическим методом на 20 морских свинках- самцах массой тела 300 – 350 г, температура тела которых, определенная ректально, в течение предшествующих 3 сут до иммунизации не превышала 39,5 ^{o} С.

Для иммунизации используют 24 - 26 образцов (ампул) вакцины. Содержимое каждой ампулы восстанавливают в первоначальном объеме (0,5 мл) стерильной 20 % МБС. Восстановленная вакцина содержит живой компонент риккетсий Провачека штамм Е (Мадрид-Е) в разведении 10^{-2}. Далее готовят десятикратное разведение вакцины 10^{-3}, для чего 1 мл вакцины в разведении 10^{-2} вносят в 9 мл стерильной 20 % МБС. Каждую дозу вакцины (в разведении 10^{-2} и 10^{-3}) вводят внутрибрюшинно 10 морским свинкам в объеме 1 мл. Наблюдение за вакцинированными животными (температурная реакция, скротальный феномен) проводят в течение 15 сут после вакцинации; лихорадочная реакция считается специфической с 4 сут после вакцинации. Вакцина не должна вызывать циклически протекающую лихорадочную реакцию (повышение ректальной температуры выше 39,5^{o}С) и орхит (опухание, напряженность и болезненность тестикул) или гибель животных. Допускается одно-двухдневный нерегулярный подъем температуры выше 39,5 ^{o} С без развития орхита у 1-2 животных из каждой группы. Допускается гибель от неспецифических причин 1-2 животных в каждой группе.

После завершения испытания вакцины по специфической безопасности проводят забор крови у морских свинок для испытания вакцины по показателю «Специфическая активность. 1. Антигенная активность».

Далее группу иммунизированных и контрольных животных используют для испытания вакцины по показателю «Специфическая активность. 2. Иммуногенность».

Специфическая активность. Должен обладать антигенной активностью, иммуногенностью, МИДэ в одной прививочной дозе должна составлять от 1000 до 100000. Определение проводят тремя методами.

1. Антигенную активность определяют по титру комплементсвязывающих антител (КС- антител) со стандартным образцом (СО) специфичного диагностикума риккетсиозного Провачека сухого для РСК в сыворотках крови морских свинок, иммунизированных вакциной в разведении 10^{-2}, должен быть 1:20 - 1:160, в разведении 10^{-3} – 1:10 - 1:80. Титр КС-антител со СО гомологичного диагностикума риккетсиозного *R. typhi* сухого для РСК должен быть на 1-2 разведения ниже, чем со СО специфичного диагностикума риккетсиозного Провачека. Не должно быть задержки гемолиза со СО гетерологичного диагностикума риккетсиозного Сибирика сухого для РСК или СО диагностикума коксиеллезного Бернета сухого для РСК. Определение проводят серологическим методом в реакции связывания комплемента (РСК) по уровню специфических КС-антител в сыворотках крови морских свинок, взятых на 19-21 сут после вакцинации, после завершения испытания по специфической безопасности вакцины. Методика определения должна быть указана в нормативной документации.

2. Иммуногенность. Не менее чем у 80 % морских свинок, иммунизированных вакциной в разведении 10^{-2}, должен развиться полный иммунитет, у остальных животных – частичный иммунитет.

Не менее чем у 50 % морских свинок, иммунизированных вакциной в разведении 10^{-3}, должен развиться полный иммунитет, не более чем у 20 % может наблюдаться его отсутствие, у остальных – частичный иммунитет.

Определение проводят биологическим методом на группе морских свинок, ранее иммунизированных вакциной в разведении 10^{-2} и 10^{-3}, после завершения испытаний специфической безопасности вакцины и последующего взятия крови на определение специфических антител.

Через 29 - 31 сут после вакцинации всем иммунизированным свинкам вводят внутрибрюшинно по 1 мл взвеси вирулентной культуры риккетсий штамма Брейнль, содержащей не менее 10000 доз возбудителя, что соответствует разведению 10^{-3} при инфицирующей дозе (ИД) культуры для морских свинок 10^{-7}. Для контроля такой же дозой вирулентной культуры одновременно

заражают трех интактных морских свинок-самцов тем же способом. Для подтверждения правильности использования величины ИД заражают еще по 3 интактных животных культурой штамма Брейнль в разведениях 10^{-6} и 10^{-7} соответственно. Всего для контроля достоверности используют 9 животных, температура тела которых, в течение предшествующих3 сут до заражения не превышала 39,5 ^{o}C.

Учет результатов проводят на основании ежедневных наблюдений в течение 21 сут за температурной реакцией и развитием скротального феномена у вакцинированных и контрольных животных.

Не менее чем у 80 % морских свинок, иммунизированных вакциной в разведении 10^{-2}, должен развиться полный иммунитет (отсутствие лихорадочной реакции и скротального феномена), у остальных животных – частичный иммунитет (укороченный лихорадочный период - не более 3 сут, и быстро проходящий за 1-2 сут скротальный феномен).

Не менее чем у 50 % морских свинок, иммунизированных вакциной в разведении 10^{-3}, должен развиться полный иммунитет, не более чем у 20 % может наблюдаться его отсутствие (лихорадка в течение не менее 5 сут и скротальный феномен разной степени выраженности), у остальных – частичный иммунитет.

У контрольных морских свинок, зараженных вирулентной культурой штамма Брейнль в разведении 10^{-3} и 10^{-6}, должны выявляться выраженная лихорадочная реакция продолжительностью не менее 5 сут и орхит у части животных.

У контрольных морских свинок, зараженных культурой в разведении 10^{-7}, хотя бы у одного животного должна быть укороченная до 4 сут лихорадочная реакция без скротального феномена, что подтверждает величину ИД вирулентной культуры штамма Брейнль 10^{-7}.

На 21 - 23 сут у контрольных животных берут кровь в объеме 2 - 3 мл, методом кардиальной пункции, получают сыворотки, в которых определяют титр КС-антител в РСК. Титр КС-антител в сыворотках всех контрольных морских свинок должен быть не менее 1:160.

3. МИДэ (минимальная инфицирующая доза риккетсий для развивающихся куриных эмбрионов) должна соответствовать разведению вакцины 10^{-6} - 10^{-8}, что определяет содержание в одной прививочной дозе вакцины от 1000 до 100000 МИДэ. Определение проводят биологическим и бактериоскопическим методом.

Определение МИДэ проводят на 6 - 7 суточных интактных РКЭ, которым в полость желточного мешка вводят вакцину в разведениях от 10^{-3} до 10^{-8} в объеме 0,5 мл. Для испытания используют 2 образца (ампулы) вакцины. Содержимое каждой ампулы растворяют в 5 мл стерильной 20 % молочно-буферной изотонической смеси (МБС) и объединяют. Полученная суспензия содержит живой компонент вакцины в разведении 10^{-3}. Далее готовят ряд последовательных десятикратных разведений от 10^{-4} до 10^{-8}. Каждым разведением вакцины заражают по 10 РКЭ, которые после введения вакцины инкубируют при температуре 34 - 36 ^{o}С и относительной влажности воздуха 40 - 60 % в течение 13 сут. Эмбрионы, погибшие с 5 по 13 сут, вскрывают в день гибели, оставшиеся живыми - на 13 сут. С помощью стерильного анатомического пинцета из каждого эмбриона извлекают кусочек желточной оболочки, который после промывания в стерильном 0,9 % растворе натрия хлорида pH 6,8-7,2 тщательно растирают на обезжиренном предметном стекле. Мазки высушивают на воздухе, фиксируют смесью Никифорова, состоящей из равных объемов спирта этилового и эфира диэтилового, затем окрашивают по методу Романовского – Гимза.

Примечания

Окраска по методу Романовского – Гимза.

1.Краситель Азур-Эозин по Романовскому (в растворе)

Приготовление фосфатно-буферного раствора (ФБР). Приготовление ФБР осуществляют в соответствии с инструкцией по применению красителя Азур - Эозин по Романовскому (в растворе). Для приготовления ФБС допускается использование готовых наборов «Фосфатный буфер» с pH 6,8-7,2. Раствор используют для разведения красителя и промывки стекол. Фосфатный буферный раствор хранят в плотно закрытом флаконе при температуре 2 – 8 ^{0}С в течение трех мес, при комнатной температуре - не более одного мес.

Приготовление раствора красителя. Непосредственно перед окраской мазков готовят раствор красителя: смешивают краситель Азур - Эозин с фосфатно-буферным раствором в соотношении 1:5 – 1:20 и фильтруют через двой-

ной бумажный фильтр. Степень разбавления красителя устанавливают опытным путем. Раствор красителя хранят при комнатной температуре в течение 6 - 8 ч.

Краситель Азур-Эозин по Романовскому (сухой). При отсутствии готового красителя Азур – Эозин по Романовскому (в растворе) допускается приготовление раствора из красителя Азур-Эозин по Романовскому сухого (далее - красящая смесь). Раствор красителя готовят из расчета 800 мг красящей смеси на 100 мл растворителя (смесь равных объемов спирта этилового и глицерина). 300 мг красящей смеси, растирают со 100 мл растворителя и далее, помешивая, добавляют 500 мг оставшейся красящей смеси до получения однородной смеси. Раствор красителя хранят в течение 1 мес в плотно закрытой темной бутыли отдельно от кислот и щелочей в защищенном от света месте. Если при хранении раствора красителя образуется осадок, рекомендуется его профильтровать.

Приготовление рабочего раствора красителя. К 1 мл раствора красителя добавляют 2 мл фосфатно-буферного раствора, 47 мл воды очищенной и перемешивают. Рабочий раствор красителя хранят при комнатной температуре в течение 6 - 8 ч.

Приготовленные мазки просматривают в световом биологическом микроскопе. Риккетсии должны иметь фиолетовую окраску и быть представленными преимущественно мелкими палочковидными формами «b» при наличии незначительного количества нитевидных форм «d» и кокковидных форм «a». Учёт результатов анализа проводят на основании оценки накопления риккетсий по условной «трех крестной системе».*

* За МИДэ принимают наибольшее разведение вакцины, которое вызывает микроскопически подтверждаемое наличие единичных риккетсий («+»), хотя бы у одного из 10 зараженных эмбрионов (РКЭ).

Оценку количества риккетсий проводят по условной «трехкрестной» системе (микроскопия мазков, окрашенных по методу Романовского - Гимза:

«−» - отсутствие риккетсий в мазке;

«+» - единичные риккетсии хотя бы в одном поле зрения;

«++» - 20-50 риккетсий в каждом поле зрения;

«+++» - неподсчитываемое количество риккетсий в каждом поле зрения.

Растворитель, выпускаемый в комплекте с препаратом. Представляет собой стерильный 0,9 % раствор натрия хлорида. Требования к качеству растворителя должны быть указаны в нормативной документации.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств», «Лекарственные формы» и ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. В соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств» и ОФС «Хранение лекарственных средств» при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.

Вакцина гемофильная тип b конъюгированная, лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения	ФС.3.3.1.0055.18 Вводится впервые

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину гемофильную тип b конъюгированную, лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения, представляющую собой очищенный капсульный полисахарид, выделенный из штамма *Haemophilus influenzae* тип *b*, ковалентно связанный с белком-носителем (столбнячный анатоксин). Капсульный полисахарид *H. influenzae* тип *b* (Hib) представляет собой полирибозилрибитолфосфат (ПРФ), линейный сополимер, состоящий из последовательно повторяющихся фрагментов 3-β -D -рибофуранозил- (1→1)- рибитол-5-фосфат [$(C_{10}H_{19}O_{12}P)_n$] с определенным размером молекул.

Конъюгация ПРФ с белком-носителем позволяет обеспечить Т-зависимый клеточный иммунный ответ на введение вакцины.

Доза вакцины содержит капсульный полисахарид *H. influenzae* тип *b*, столбнячный анатоксин, и вспомогательные вещества.

ПРОИЗВОДСТВО

Все стадии производственного процесса основаны на использовании системы посевного материала, обеспечивающей стабильное получение вакцины для профилактики гемофильной инфекции тип b с требуемой иммуногенностью и безопасностью для человека, должны быть валидированы.

Технология получения вакцины гемофильной тип b конъюгированной предусматривает культивирование штамма-продуцента Hib на плотной питательной среде с последующим выделением капсульного полисахарида Hib, его очисткой и конъюгацией с белком-носителем. Не допускается использование в составе питательных сред для культивирования штамма *H. influenzae* тип *b* любых продуктов животного происхождения.

Оценка качества производственных штаммов должна проводиться на производстве каждый раз при получении новой партии маточной культуры.

Штамм-продуцент *H. influenzae* серотип *b* должен быть охарактеризован по источнику его выделения и способности продуцировать полисахарид Hib.

Доза вакцины содержит капсульный полисахарид *H. influenzae* тип *b,* столбнячный анатоксин, сахарозу, в качестве вспомогательного вещества.

Испытания на этапах производства субстанции

Бактериологическая чистота полученной биомассы должна оцениваться и подтверждаться методами, применяемыми для оценки чистоты штамма-продуцента.

Очищенный капсульный полисахарид Hib контролируют по следующим показателям: содержание фосфора, содержание капсульного полисахарида, содержание рибозы, специфическая активность, пирогенность, токсичность, подлинность, содержание белка, содержание нуклеиновых кислот, молекулярные параметры, стерильность.

Субстанцией вакцины гемофильной тип b конъюгированной является капсульный полисахарид Hib конъюгированный со столбнячным анатоксином. Контроль субстанции проводится по следующим показателям: содержание капсульного полисахарида, содержание фосфора, содержание белка, соотношение полисахарид-белок, содержание свободного полисахарида, стерильность, остаточные реагенты, не прореагировавшие функциональные группы.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Лиофильная масса белого цвета.

Восстановленный препарат - бесцветная прозрачная жидкость. Определение проводят визуально.

Подлинность. Положительная реакция латекс-агглютинации со специфической антительной диагностической системой против возбудителя *H. influenzae* тип *b* или определение проводят другим подходящим иммунохимическим методом.

Растворимость. Не более 3 мин. Содержимое ампулы с лиофилизатом растворяют в 0,5 мл растворителя (вода для инъекций). Определение проводят визуально.

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH. От 6,5 до 7,5 (в восстановленном препарате). Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Потеря в массе при высушивании. Не более 3 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение потери массы при высушивании».

Точность розлива. Не более 10 %. Определение проводят весовым методом. 8 ампул без этикеток обрабатывают смесью спирта с эфиром (1:1) и помещают в эксикатор на 3 ч. Затем верхнюю часть каждой ампулы надпиливают и удаляют. Вскрытые ампулы с веществом взвешивают на аналитических весах, после чего содержимое удаляют, ампулы промывают водой, ополаскивают водой очищенной. После этого ампулы выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100-105 °С до постоянной массы. По разности масс ампулы с содержимым и без него рассчитывают коэффициент вариации (V) в процентах по формулам:

$$V = \frac{S \cdot 100}{\bar{x}},$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum(X - \bar{x})^2}{n - 1}},$$

Где: S – стандартное отклонение;

$\bar{x}$ – среднее арифметическое значение массы вещества в ампуле;

X – масса вещества в каждой ампуле;

n – число ампул.

Фосфор. Содержание фосфора в вакцине должно быть от 0,8 до 1,2 мкг /доза. Определение проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрическое определение фосфора в биологических лекарственных препаратах».

Капсульный полисахарид. Не менее 80 % от номинального содержания. (От 9,5 до 14,3 мкг/доза). Содержание капсульного полисахарида в вакцине (Хкп) определяют путем пересчета количества фосфора (Р) на специфический полисахарид (Кпс), используя коэффициент пересчета (Кпс) =11,9, который вычисляют по формуле:

$$\text{Кпс} = \frac{\text{Молекулярная масса (Кпс)}\,(367{,}8\ \text{г})}{\text{Молекулярная масса фосфора}\,(30{,}9\ \text{г})}$$

Содержание капсульного полисахарида (Хкп) в микрограммах в дозе (0,5 мл), препарата вычисляют по формуле:

$$\text{Хкп} = \text{Р} \cdot \text{Кпс},$$

где: Р - содержание фосфора в 1 дозе препарата в микрограммах;

Кпс - коэффициент пересчета фосфора на специфический полисахарид, равный 11,9.

Количество полисахарида можно определять с помощью подходящих иммунохимических методов, высокоэффективной анионообменной жидкостной хроматографии с импульсным амперометрическим детектированием или с помощью количественного определения рибозы.

Стерильность. Вакцина должна быть стерильна. Определение проводят методом прямого посева в соответствии с ОФС «Стерильность».

Аномальная токсичность. Вакцина должна быть нетоксичной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность» Тест для вакцин и сывороток.

Пирогенность. Вакцина должна быть апирогенной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность».

Сахароза. От 20 до 30 мг/доза. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение сахаров спектрофотометрическим методом».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С в соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Вакцина полиомиелитная пероральная, двухвалентная, живая аттенуированная 1, 3 типов, раствор для приема внутрь	ФС.3.3.1.0056.18 Взамен ФС.3.3.1.0037.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину полиомиелитную пероральную, двухвалентную, живую аттенуированную 1, 3 типов, раствор для приема внутрь.

Вакцина полиомиелитная пероральная, двухвалентная, живая аттенуированная 1, 3 типов, раствор для приема внутрь представляет собой препарат из живых аттенуированных штаммов Сэбина вируса полиомиелита: тип 1 (*LSc 2ab*), тип 3 (*Leon 12 a_1b*), выращенных на первичной культуре клеток почек африканских зеленых мартышек (КПЗМ) или на первичной культуре клеток почек африканских зеленых мартышек с одним пассажем на перевиваемой культуре клеток линии *Vero*. Вакцина содержит два типа вируса полиомиелита в виде раствора 0,5 % гидролизата лактальбумина в растворе Эрла. В одной дозе вакцины содержание вируса полиомиелита 1 типа составляет не менее $10^{6,0}$ $ТЦД_{50}$ 3 типа - не менее $10^{5,5}$ $ТЦД_{50.}$ Количество инфекционных единиц вируса (ИЕ) выражается в тканевых цитопатогенных дозах ($ТЦД_{50}$).

Препарат предназначен для специфической профилактики полиомиелита.

В состав вакцины входит стабилизатор и консервант.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство пероральной полиомиелитной вакцины основано на использовании производственных штаммов Сэбина вируса полиомиелита: тип 1 - *LSc 2ab*, тип 3 – *Leon 12 a_1b и* должно осуществляться в соответствии с требованиями ОФС: «Вакцины и анатоксины» «Требования к клеточным культурам-субстратам производства в биологических лекарственных препаратов», «Вирусная безопасность», «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Рабочие посевные серии готовят из основных посевных вирусов с использованием не более трех пассажей для вируса типа 1 и не более двух пассажей для вируса типа 3.

Все этапы производства вакцины должны осуществляться с соблюдением установленных требований организации производства и контроля качества лекарственного препарата, гарантирующих качество и безопасность для человека.

Основные и рабочие посевные серии должны быть охарактеризованы стерильны, иметь титр не менее 10^7 ИЕ в 1 мл, быть типоспецифичны, авирулентны, иметь характеристику по генетическому маркеру rct/40, соответствующую аттенуированным штаммам.

Рабочие посевные вирусы должны проходить испытания на соответствие требованиям не реже, чем 1 раз в год по основным показателям: стерильность, специфическая активность, генетический признак rct/40.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачная жидкость от желтовато-красного до розово-малинового цвета, без осадка. Метод определения визуальный.

Подлинность. Должна быть типоспецифичной, должна содержать живые вирусы полиомиелита, аттенуированные штаммы Сэбина тип 1 и тип 3. Определение проводят в реакции нейтрализации цитопатогенной активности вакцины соответствующими гомотипичными диагностическими энтерови-

русными сыворотками типов 1 и 3 в культуре клеток *Hep-2* Цинциннати параллельно со стандартным образцом (СО) как моно-, так и двухвалентного препарата. Определение проводят по методике, описанной в разделе «Специфическая активность». Титр вакцины в присутствии смеси гомотипичных диагностических энтеровирусных сывороток должен быть снижен не менее, чем на 2 lg (не менее чем в 100 раз).

Прозрачность. Должна быть прозрачной. Метод определения визуальный. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Цветность. Должна быть от желтовато-красного до розово-малинового цвета. Метод определения визуальный. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем».

pH. От 6,8 до 7,2. Метод определения потенциометрический. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Стерильность. Должна быть стерильной. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методом прямого посева или мембранной фильтрации.

Специфическая активность. Должна содержать в одной прививочной дозе (0,2 мл) инфекционных единиц вируса ($ТЦД_{50}$) – не менее: тип 1 – $10^{6,0}$ тип 3 – $10^{5,5}$. Определение специфической активности проводят на культуре клеток *Hep-2* Цинциннати по цитопатогенному действию (ЦПД) вируса в сравнении с СО.

Исходные клетки *Hep-2* Цинциннати, поддерживают многократным пассированием в питательной среде Игла МЕМ с добавлением 5 % сыворотки крови плодов коровы, содержащей гентамицина сульфат 40 мкг/мл.

При пассировании клеточных культур клетки снимают с поверхности стекла смесью растворов трипсина и Версена (1:1), подогретых до температуры 37 °С, засевают в количестве от $1 \cdot 10^4$ до $3 \cdot 10^4$ клеток на 1 $см^2$ площади

одной из боковых сторон культурального флакона и выращивают при температуре (37±1) °С. Клеточный монослой формируется на 3 – 4 сут.

Титрование проводят в 96-луночных панелях для культивирования клеток.

Содержание каждого типа вируса определяют в реакции нейтрализации путем нейтрализации другого типа вируса соответствующей гомотипичной диагностической энтеровирусной моновалентной сывороткой.

Рабочее разведение гомотипичной сыворотки к каждому из двух типов полиовирусной вакцины должно снижать титр вируса не менее, чем на 2 lg (не менее, чем в 100 раз). В каждое испытание наряду с исследуемым образцом включают одновременное титрование СО вакцины. Разведения вакцины и СО готовят на питательной среде Игла МЕМ, содержащей 2 % сыворотки крови плодов коров кратностью 1:5. Диапазон разведений должен включать по меньшей мере три разведения препаратов, при которых вирус разрушает от 10 % до 90 % зараженных клеток. В каждую лунку панели вносят 0,05 мл выбранных разведений вакцины (тип 1 или тип 3) или СО и 0,05 мл рабочего разведения нейтрализующей сыворотки к другому типу вируса (по 8 – 12 лунок на разведение) и инкубируют 3 ч при температуре (37±1) °С. Затем во все лунки панелей при титровании двухвалентной вакцины добавляют по 0,1 мл взвеси клеток в концентрации 100000 – 200000 клеток в мл. В контрольные лунки вносят по 0,1 мл клеточной суспензии и 0,1 мл питательной среды. Панели инкубируют в термостате при температуре (37±1) °С в газовой среде, содержащей 5 % CO_2, в течение 7 сут. Клетки *Hep-2* в лунках панели просматривают в инвертированном микроскопе на наличие цитопатогенного действия вирусов на 3, 5 и 7 дни инкубирования. $ТЦД_{50}$ /мл вируса высчитывают на 7 сут по методу Рида и Менча.

Так как разведения вируса, взятые в опыт по определению титра в двухвалентной вакцине, разводятся в два раза нейтрализующей сывороткой, значение титра 10-дозовой вакцины (0,2 мл/доза) должен быть увеличен на 0,6 lg. Титрование каждой серии полиомиелитной вакцины проводят не ме-

нее двух раз, но не более четырех раз.

Учитывают результаты только тех титрований, в которых значение десятичного логарифма титра одновременно титруемого с вакциной СО не отличается от среднего значения логарифма титра СО более чем на 0,5. Вычисляют среднюю арифметическую величину титра из результатов двух титрований вакцины и делают заключение о соответствии или несоответствии вакцины требованиям, предъявляемым к специфической активности препарата. Повторные титрования забракованных серий вакцины не допускаются.

Термостабильность. Должна быть стабильна. Величина титра вируса после прогревания вакцины может снижаться не более, чем на 0,5 lg. Не менее 3 флаконов от каждой серии вакцины и СО прогревают при температуре (37±1) °С в течение 48 ч; другие 3 флакона препарата и СО (контроль) хранят при температуре минус 20 °С. Вакцины и СО в прогретых и контрольных образцах титруют одновременно по методике, изложенной в разделе «Специфическая активность». Титр определяют в одном опыте, повторное титрование не допускается.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Транспортирование и хранение. В соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». При температуре от 2 до 8 °С. Допускается размораживание с повторным однократным замораживанием вакцины до температуры минус 20 °С.

Пробиотик бактерий сенной палочки поликомпонентный, лиофилизат для приготовления суспензии для приема внутрь и местного применения	ФС.3.3.1.0057.18 Взамен ФС 42-3476-98

Настоящая фармакопейная статья распространяется на пробиотик бактерий сенной палочки поликомпонентный, лиофилизат для приготовления суспензии для приема внутрь и местного применения. Препарат представляет собой биомассу живых бактерий антагонистически активных штаммов *Bacillus subtilis* 3 и *Bacillus licheniformis* 31 лиофилизированную в среде культивирования с добавлением защитной среды высушивания (сахарозо-желатиновой). В одной дозе препарата должно содержаться живых микробных клеток *B.subtilis* 3 от $1 \cdot 10^9$ КОЕ до $8 \cdot 10^9$ КОЕ и *B. licheniformis* 31 от $0{,}1 \cdot 10^9$ КОЕ до $2 \cdot 10^9$ КОЕ.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство препарата осуществляется в соответствии с требованиями, изложенными в ОФС «Пробиотики» и ОФС «Споровые пробиотики» » и ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков».

Контроль качества производственных пробиотических штаммов и штаммов для контроля пробиотиков проводится не реже 1 раза в год.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Кристаллическая или пористая масса от светло-серого до бежевого цвета. Определение проводят визуально.

Подлинность. В мазках, окрашенных по Цилю-Нильсену, должны присутствовать вегетативные клетки синего цвета и розовые споры. Испытание проводят микроскопически в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков». Подлинность подтверждается специфической активностью (раздел «Специфическая активность»).

Время восстановления препарата. Не более 2 мин. При добавлении во флакон с препаратом из расчета на 1 дозу 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида или воды для инъекций, содержимое в течение 2 мин должно полностью диспергироваться с образованием гомогенной непрозрачной суспензии бежевого или беловато-серого цвета. Испытание проводят визуально в соответствии с ОФС «Пробиотики».

pH. От 6,0 до 8,0 (восстановленный препарат). Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Потеря в массе при высушивании. Не более 3,5 %. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании» или другим валидированным методом.

Специфическая безвредность. Препарат должен быть безвреден для белых мышей при пероральном введении одной дозы. Определение проводят в соответствии с ОФС «Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo*».

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов (микробиологическая чистота). Категория 5.3.А:

- Бактерии - контаминанты должны отсутствовать (доза.);
- дрожжевые и плесневые грибы должны отсутствовать (доза.);

В мазках, приготовленных из восстановленных испытуемых образцов и окрашенных по Цилю-Нильсену, должны присутствовать вегетативные клетки синего цвета и розовые споры.

Определение на отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота» методом посева штрихом.

Специфическая активность. В одной дозе препарата должно содержаться живых микробных клеток *B.subtilis* 3 от $1 \cdot 10^9$ КОЕ до $8 \cdot 10^9$ КОЕ и *B. licheniformis 31* от $0{,}1 \cdot 10^9$ КОЕ до $2 \cdot 10^9$ КОЕ. Определение количества живых бактериальных клеток в 1 дозе проводят методом серийных разведений в 0,9 % растворе натрия хлорида с последующим высевом на среду Гаузе № 2 (в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков» (метод Коха). Бактерий, входящие в состав препарата, при росте на среде Гаузе№2 образуют визуально различимые по форме колонии:

- *B.subtilis 3* образует крупные серовато-матовые колонии, шероховатые с фестончатыми краями, хорошо снимающиеся с агара;
- *B. licheniformis 31* образует гладкие, бежево-коричневые колонии с грубой поверхностью, плотно прикрепленные к агару.

Определение антагонистической активности проводят методом отсроченного антагонизма на среде Гаузе №2. Зоны задержки роста тест-штаммов *S. sonnei* 5063; *S. typhimurium* 55 должны быть не менее 10 мм, для *Staphylococcus aureus* АТ 6538-Р должны быть не менее 15 мм, а для *C. albicans* АТСС10231 должны быть не менее 12 мм. Определение проводят в соответствие с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Транспортирование и **хранение.** В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств» при температуре от 2 до 8 ^{o}C.

Пробиотик бактерий кишечной палочки монокомпонентный лиофилизат для приготовления суспензии для приема внутрь	ФС.3.3.1.0058.18 Взамен ФС 42-3365-97

Настоящая фармакопейная статья распространяется на пробиотик бактерий кишечной палочки монокомпонентный, лиофилизат для приготовления суспензии для приема внутрь. Препарат представляет собой биомассу живых бактерий антагонистически активного штамма *Escherichia coli* М-17, лиофилизированную в среде культивирования с добавлением защитной среды высушивания (сахарозо-желатиновой). В одной дозе препарата должно содержаться живых микробных клеток кишечной палочки в количестве не менее 10^7 КОЕ.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство препарата осуществляется в соответствии с требованиями, изложенными в ОФС «Пробиотики» и ОФС «Колисодержащие пробиотики» и ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков».

Контроль качества производственных пробиотических штаммов и штаммов для контроля пробиотиков проводится не реже 1 раза в год.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Кристаллическая или пористая масса желтоватого или бежевого, или беловато-серого цвета различной интенсивности. Имеет специфический запах. Определение проводят органолептически.

Подлинность. В мазках, окрашенных по Граму, должны присутствовать грамотрицательные короткие одиночные палочки с закругленными концами, длиною 1,5 - 4,0 мкм. Испытание проводят микроскопически в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков». Подлинность подтверждается специфической активностью (раздел «Специфическая активность»).

Время восстановления препарата. Не более 5 мин. При добавлении во флакон с препаратом 0,9 % раствора натрия хлорида, из расчета 1 мл на 1 дозу, содержимое должно полностью диспергироваться в течение 5 мин с образованием гомогенной непрозрачной суспензии желтоватого или бежевого, или беловато-серого цвета». Испытание проводят визуально в соответствии с ОФС «Пробиотики».

pH. От 5,0 до 7,0 (восстановленный препарат). Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Потеря в массе при высушивании. Не более 3,5 %. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании» или другим валидированным методом.

Специфическая безвредность. Препарат должен быть безвреден для белых мышей при пероральном введении одной дозы. Определение проводят в соответствии с ОФС «Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo*».

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов (микробиологическая чистота). Категория 5.3.А:

- Бактерии - контаминанты должны отсутствовать (доза);
- дрожжевые и плесневые грибы должны отсутствовать (доза);
- бактериофаг не более 10 БОЕ (доза).

В мазках, приготовленных из восстановленных испытуемых образцов и окрашенных по Граму должны быть только характерные для препарата грамотрицательные одиночные палочки с закругленными концами длиной 1,5 - 4,0 мкм.

Определение на отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота» методом прямого посева.

Специфическая активность. В одной дозе препарата должно содержаться живых микробных клеток кишечной палочки в количестве не менее $10 \cdot 10^9$ КОЕ. Определение количества живых бактериальных клеток в 1 дозе проводят методом серийных разведений в 0,9 % растворе натрия хлорида с последующим высевом на агар Эндо. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков» (метод Коха).

Определение антагонистической активности проводят методом отсроченного антагонизма на среде Гаузе №2. Зоны задержки роста тест-штаммов *S.sonnei* 5063*; S.flexneri* 337, 170*; E.coli* 0157; *P.mirabilis* Н-237, *P.vulgaris* 177 препаратом должны быть не менее 15 мм.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Транспортирование и **хранение.** В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств» при температуре от 2 до 8 ^{o}С.

Пробиотик бифидобактерий бифидум + кишечная палочка поликомпонентный, лиофилизат для приготовления суспензии для приема внутрь	ФС.3.3.1.0059.18 Взамен ФС 42-3268--96

Настоящая фармакопейная статья распространяется на пробиотик бифидобактерий бифидум + кишечная палочка поликомпонентный, лиофилизат для приготовления суспензии для приема внутрь. Препарат представляет собой биомассу живых микробных клеток бактерий антагонистически активных штаммов *Escherichia coli* М-17 и *Bifidobacterium bifidum* 1, лиофилизированную в среде культивирования с добавлением защитной среды высушивания (сахарозо-желатино-молочной). В одной дозе препарата должно содержаться живых микробных клеток кишечной палочки в количестве не менее 10^7 КОЕ и бифидобактерий – не менее 10^7 КОЕ».

ПРОИЗВОДСТВО

Производство препарата должно осуществляться в соответствие с требованиями, изложенными в ОФС «Колисодержащие пробиотики» и ОФС «Бифидосодержащие пробиотики» и ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков».

Контроль качества производственных пробиотических штаммов и штаммов для контроля пробиотиков проводится не реже 1 раза в год.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Кристаллическая или пористая масса бежевого или беловато-серого цвета различной интенсивности. Имеет специфический запах. Определение проводят органолептически.

Подлинность. В мазках, окрашенных по Граму, должны присутствовать грамположительные полиморфные палочки с бифуркацией или утолщением на одном или двух концах, длиной от 4,0 до 5,0 мкм располагающиеся в виде отдельных клеток или скоплений и грамотрицательные короткие одиночные палочки с закругленными концами, длиною 1,5-4,0 мкм. Испытание проводят микроскопически в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков». Подлинность подтверждается специфической активностью (раздел «Специфическая активность»).

Время восстановления препарата. Не более 5 мин. При добавлении во флакон с препаратом из расчета 1 мл на 1 дозу 0,9 % раствора натрия хлорида, содержимое в течение 5 мин должно полностью диспергироваться с образованием гомогенной непрозрачной суспензии бежевого или беловато-серого цвета. Испытание проводят визуально в соответствии с ОФС «Пробиотики».

pH. От 5,0 до 7,0 (восстановленный препарат). Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Потеря в массе при высушивании. Не более 3,5 %. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании» или другим валидированным методом.

Специфическая безвредность. Должен быть безвреден для белых мышей при пероральном введении одной дозы. Определение проводят в соответствии с ОФС «Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo*».

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов (микробиологическая чистота). Категория 5.3.А. Определение проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

Специфическая активность. В одной дозе препарата должно содержаться не менее 10^7 КОЕ кишечной палочки и не менее 10^7 КОЕ бифидобактерий (в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков» (комбинированный метод).

Определение антагонистической активности проводят методом отсроченного антагонизма на среде Гаузе №2. Зоны задержки роста тест-штаммов *S.sonnei* 5063; *S.flexneri* 337, 170; *E.coli* 0157; *P.mirabilis* Н-237, *P.vulgaris* 177 препаратом должны быть не менее 15 мм.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Транспортирование и **хранение.** В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств» при температуре от 2 до 8 ^{o}C.

Пробиотик лактобактерий монокомпонентный, лиофилизат для приготовления суспензии для приема внутрь и местного применения	ФС.3.3.1.0060.18 Взамен ФС 42-3256-96

Настоящая фармакопейная статья распространяется на пробиотик лактобактерий монокомпонентный, лиофилизат для приготовления суспензии для приема внутрь и местного применения. Препарат представляет собой биомассу живых бактерий антагонистически активного штамма *Lactobacillus plantarum* 8Р-А3 или *L. fermentum* 90Т-С4, лиофилизированную в среде культивирования с добавлением защитной среды высушивания (сахарозо-желатино-молочной). В одной дозе препарата должно содержаться живых лактобактерий в количестве не менее $2 \cdot 10^9$ КОЕ.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство препарата должно осуществляться в соответствие с требованиями, изложенными в ОФС «Лактосодержащие пробиотики», ОФС «Пробиотики» и ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков».

Контроль качества производственных пробиотических штаммов и штаммов для контроля пробиотиков проводится не реже 1 раза в год.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Кристаллическая или пористая масса желтовато-бежевого или беловато-серого цвета различной интенсивности. Имеет специфический запах. Определение проводят органолептически.

Подлинность. В мазках, окрашенных по Граму, должны присутствовать грамположительные прямые палочки длиной от 0,7 до 3,0 мкм, располагающиеся беспорядочными скоплениями или отдельными короткими цепочками. Испытание проводят микроскопически в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков». Подлинность подтверждается специфической активностью (см. раздел «Специфическая активность»).

Время восстановления препарата. Не более 5 мин. При добавлении во флакон с препаратом из расчета 1 мл на 1 дозу 0,9 % раствора натрия хлорида, содержимое должно полностью диспергироваться в течение 5 мин с образованием гомогенной непрозрачной суспензии желтовато-бежевого или беловато-серого цвета. Испытание проводят визуально в соответствии с ОФС «Пробиотики».

pH. От 4,5 до 6,0 (восстановленный препарат). Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Потеря в массе при высушивании. Не более 3,5 %. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании» или другим валидированным методом.

Специфическая безвредность. Препарат должен быть безвреден для белых мышей при пероральном введении одной дозы. Определение проводят в соответствии с ОФС «Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo*».

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов (микробиологическая чистота). Категория 5.3.А. Определение проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

Специфическая активность. В одной дозе препарата должно содержаться не менее $2 \cdot 10^9$ КОЕ лактобактерий. Определение количества живых бактериальных клеток в 1 дозе проводят методом серийных разведений в 0,9 % растворе натрия хлорида с последующим высевом на среду МРС-4. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков» (метод Коха).

Показатель активности кислотообразования должен быть не ниже 200 °Т. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков», для выращивания лактобактерий используют среду МРС-1.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Транспортирование и **хранение.** При температуре от 2 до 8 °С в соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Пробиотик бифидобактерий бифидум монокомпонентный, лиофилизат для приготовления суспензии для приема внутрь и местного применения	ФС.3.3.1.0061.18 Взамен ФС 42-3947-00

Настоящая фармакопейная статья распространяется на пробиотик бифидобактерий бифидум монокомпонентный, лиофилизат для приготовления суспензии для приема внутрь и местного применения. Препарат представляет собой биомассу живых антагонистически активных бактерий штамма *Bifidobacterium bifidum* 1 или 791, лиофилизированную в среде культивирования с добавлением защитной среды высушивания (сахарозо-желатино-молочной). В одной дозе препарата должно содержаться живых бифидобактерий в количестве не менее 10^7 КОЕ».

ПРОИЗВОДСТВО

Производство препарата должно осуществляться в соответствие с требованиями, изложенными в ОФС «Бифидосодержащие пробиотики», ОФС «Пробиотики» и ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков».

Контроль качества производственных пробиотических штаммов и штаммов для контроля пробиотиков проводится не реже 1 раза в год.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Кристаллическая или пористая масса разных оттенков бежевого, светло-коричневого или беловато-серого цвета различной интенсивности. Имеет специфический запах. Определение проводят органолептически.

Подлинность. В мазках, окрашенных по Граму, должны присутствовать грамположительные полиморфные палочки с бифуркацией на одном или двух концах, длиной от 4,0 до 5,0 мкм располагающиеся в виде отдельных клеток или скоплений. Испытание проводят микроскопически в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков». Подлинность подтверждается специфической активностью (раздел «Специфическая активность»).

Время восстановления препарата. Не более 5 мин. При добавлении во флакон с препаратом из расчета 1 мл на 1 дозу 0,9 % раствора натрия хлорида, содержимое в течение 5 мин должно полностью диспергироваться с образованием гомогенной непрозрачной суспензии различных оттенков, бежевого, светло-коричневого или беловато-серого цвета. Испытание проводят визуально в соответствии с ОФС «Пробиотики».

pH. От 5,5 до 6,5 (восстановленный препарат). Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Потеря в массе при высушивании. Не более 3,5 %. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании» или другим валидированным методом.

Специфическая безвредность. Препарат должен быть безвреден для белых мышей при пероральном введении одной дозы. Определение проводят в соответствии с ОФС «Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo*».

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов (микробиологическая чистота). Категория 5.3.А. Определение проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

Специфическая активность. В одной дозе препарата должно содержаться не менее 10^7 КОЕ бифидобактерий. Определение количества живых бактерий проводят пробирочным методом учета колоний в полужидкой модифицированной печеночной среде Блаурокка в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков».

Показатель активности кислотообразования должен быть не ниже 90 °Т. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков», для выращивания бифидобактерий используют полужидкую модифицированную печеночную среду Блаурокка.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Транспортирование и **хранение.** При температуре от 2 до 8 °С в соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Пробиотик лактобактерий ацидофильных поликомпонентный, лиофилизат для приготовления суспензии для приема внутрь и местного применения	ФС.3.3.1.0062.18 Взамен ФС 42-3946-00

Настоящая фармакопейная статья распространяется на пробиотик лактобактерий ацидофильных поликомпонентный, лиофилизат для приготовления суспензии для приема внутрь и местного применения. Препарат представляет собой биомассу живых бактерий антагонистически активных штаммов *Lactobacillus acidophilus* 100 аш, *L.acidophilus* NK и *L.acidophilus* $К_3Ш_{24}$, лиофилизированную в среде культивирования с добавлением защитной среды высушивания (сахарозо-желатино-молочной). В одной дозе препарата должно содержаться живых микробных клеток ацидофильных лактобактерий в количестве не менее 10^7 КОЕ.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство препарата должно осуществляться в соответствие с требованиями, изложенными в ОФС «Лактосодержащие пробиотики», ОФС «Пробиотики» и ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков».

Контроль качества производственных пробиотических штаммов и штаммов для контроля пробиотиков проводится не реже 1 раза в год.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Кристаллическая или пористая масса бежевого или беловато-серого цвета различной интенсивности. Имеет специфический запах. Определение проводят органолептически.

Подлинность. В мазках, окрашенных по Граму, должны присутствовать грамположительные палочки, располагающиеся поодиночке или в виде цепочек из 2-4 и более клеток. Испытание проводят микроскопически в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков». Подлинность подтверждается специфической активностью (раздел «Специфическая активность»).

Время восстановления препарата. Не более 5 мин. При добавлении во флакон с препаратом из расчета 1 мл на 1 дозу 0,9 % раствора натрия хлорида, содержимое в течение 5 мин должно полностью диспергироваться с образованием гомогенной непрозрачной суспензии желтовато-бежевого или беловато-серого цвета. Испытание проводят визуально в соответствии с ОФС «Пробиотики».

pH. От 4,0 до 5,0 (восстановленный препарат). Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Потеря в массе при высушивании. Не более 3,5 %. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании» или другим валидированным методом.

Специфическая безвредность. Препарат должен быть безвреден для белых мышей при пероральном введении одной дозы. Определение проводят в соответствии с ОФС «Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo*».

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов (микробиологическая чистота). Категория 5.3.А Определение проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

Специфическая активность. В одной дозе препарата должно содержаться не менее 10^7 КОЕ ацидофильных лактобактерий. Определение количе-

ства живых ацидофильных лактобактерий проводят пробирочным методом наиболее вероятных чисел в стерильном обезжиренном молоке (в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков».

Показатель активности кислотообразования должен быть не ниже 200 °Т. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков», для выращивания ацидофильных лактобактерий используют стерильное обезжиренное молоко.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Транспортирование и **хранение.** При температуре от 2 до 8 °С в соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Бактериофаг бактерий дизентерии поливалентный, раствор для приема внутрь и ректального введения	ФС.3.3.1.0063.18 Взамен ГФ X, ст. 78, ВФС 42-2460-95

Настоящая фармакопейная статья распространяется на бактериофаг бактерий дизентерии поливалентный, раствор для приема внутрь и ректального введения. Препарат представляет собой раствор, содержащий смесь очищенных бактериофагов *Shigella flexneri* 1, 2, 3, 4 и 6 сероваров и *Shigella sonnei* в количестве не менее 10^8 для серотипов *S. flexneri* 1, 2, 3, 4; не менее 10^6 – серотипа *S. flexneri* 6; не менее 10^7 – *S. sonnei* в 1 мл препарата. В состав препарата входят вспомогательные вещества.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство лечебно-профилактического бактериофага бактерий дизентерии и требования, предъявляемые к производственным штаммам, штаммам для контроля и маточным бактериофагам, должны соответствовать требованиям, изложенным в ОФС «Бактериофаги».

Контроль качества производственных штаммов должен проводиться не реже 1 раза в год.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачная жидкость желтого цвета различной степени интенсивности, допускается зеленоватый оттенок. Определение проводят

визуально.

Подлинность. Препарат должен специфически лизировать бактерии *S. flexneri* 1, 2, 3, 4, 6 сероваров и *S. sonnei.*

Подлинность препарата подтверждается его специфической активностью по методике, изложенной в разделе «Специфическая активность».

pH. От 6,6 до 7,8. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Стерильность. Препарат должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методом прямого посева или методом мембранной фильтрации с использованием тиогликолевой среды и жидкой среды Сабуро.

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Для контроля отбирают по 3 флакона от серии, объединяя их в общую пробу. Тест-дозу в объеме 1 мл вводят подкожно белым мышам массой 19-21 г (используют 5 животных). Срок наблюдения 48 ч. В течение предусмотренного срока не должна погибнуть ни одна мышь.

Специфическая активность. Препарат должен лизировать бактерии в разведении не менее:

10^{-8} – *S. flexneri* 1, 2, 3, 4 сероваров;

10^{-7} – *S. sonnei*;

10^{-6} – *S. flexneri* 6 серовара, что соответствует содержанию фаговых частиц в количестве не менее 10^{8} для серотипов *S. flexneri* 1, 2, 3, 4; не менее 10^{6} – серотипа *S. flexneri* 6; не менее 10^{7} серотипа – *S. sonnei* в 1 мл препарата».

Определение активности проводят титрованием по методу Аппельмана в соответствии с ОФС «Бактериофаги» (раздел «Специфическая активность»), используя бульон мясо-гидролизный, или питательный бульон для культивиро-

вания микроорганизмов мясопептоновый агар (МПБ) или аналогичный, или бульон Хоттингера.

Для контроля отбирают по 2 образца (флакона) от каждой серии. Для определения активности используют по 1 штамму *S. flexneri* 1, 3, 4 сероваров, по 2 штамма *S. flexneri* 2 и 6 сероваров и 3 штамма *S. sonnei.*

Если хотя бы на одном штамме активность препарата оказывается меньше установленной, контроль проводят на удвоенном количестве штаммов того же вида бактерий, который дал неудовлетворительный результат. Препарат считают выдержавшим испытания, если лизировались не менее 75% штаммов, использованных при первом и повторном титрованиях.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». В маркировке лекарственной формы «раствор» должна быть предусмотрена предупредительная надпись «При помутнении не применять».

Транспортирование и **хранение.** В защищенном от света месте, при температуре от 2 до 8 °С в соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С в пределах 1 мес.

Бактериофаг бактерий клебсиелл поливалентный, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения	ФС.3.3.1.0064.18 Взамен ФС 42-3393-97

Настоящая фармакопейная статья распространяется на бактериофаг бактерий клебсиелл поливалентный, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения. Препарат представляет собой раствор, содержащий смесь очищенных бактериофагов бактерий *Klebsiella pneumoniae, Klebsiella ozaenae, Klebsiella rhinoscleromatis* в количестве не менее 10^4 каждого вида бактериофагов в 1 мл препарата. В состав препарата входят вспомогательные вещества.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство лечебно-профилактического бактериофага бактерий клебсиелл и требования, предъявляемые к производственным штаммам, штаммам для контроля и маточным бактериофагам, должны соответствовать требованиям, изложенным в ОФС «Бактериофаги».

Контроль качества производственных штаммов должен проводиться не реже 1 раза в год.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачная жидкость желтого цвета различной степени интенсивности, допускается зеленоватый оттенок. Определение проводят

визуально.

Подлинность. Препарат должен специфически лизировать бактерии *K. pneumoniae, K.* ozaenae, *K. rhinoscleromatis* Подлинность препарата подтверждается его специфической активностью согласно разделу «Специфическая активность».

pH. От 6,6 до 7,8. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Стерильность. Препарат должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методом прямого посева или методом мембранной фильтрации с использованием тиогликолевой среды и жидкой среды Сабуро.

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичным в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Для контроля отбирают по 3 флакона от серии, объединяя их в общую пробу. Тест-дозу в объеме 1 мл вводят подкожно белым мышам массой 19-21 г (используют 5 животных).

Срок наблюдения 48 ч. В течение предусмотренного срока наблюдения не должна погибнуть ни одна мышь.

Специфическая активность. Препарат должен лизировать бактерии *K. pneumoniae, K. ozaenae, K.rhinoscleromatis* в разведении не менее 10^{-4}, что соответствует содержанию фаговых частиц каждого вида бактериофагов *K. pneumoniae, K.ozaenae, K.rhinoscleromatis* в количестве не менее 10^4 в 1 мл препарата.

Определение проводят титрованием по методу Аппельмана в соответствии с ОФС «Бактериофаги» (раздел «Специфическая активность») на питательном бульоне для культивирования микроорганизмов – мясо-пептонном бульоне (МПБ) или аналогичном, или бульоне Хоттингера.

Для контроля отбирают по 2 образца (флакона) от каждой серии. Для

определения активности используют по 8 штаммов *K. pneumoniae, K. ozaenae, K. rhinoscleromatis*, которые не использовались при изготовлении препарата.

Если хотя бы на одном штамме активность препарата оказывается меньше установленной (10^{-4}), контроль проводят на удвоенном количестве штаммов того же вида бактерий, который дал неудовлетворительный результат. Препарат считают выдержавшим испытания, если лизировались не менее 75% штаммов, использованных при первом и повторном титрованиях.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». В маркировке лекарственной формы «раствор» должна быть предусмотрена предупредительная надпись «При помутнении не применять».

Транспортирование и **хранение.** В сухом, защищенном от света месте, при температуре от 2 до 8 °С в соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С в пределах 1 мес.

Бактериофаг бактерий протея, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения	ФС.3.3.1.0065.18 Взамен ФС 42-3226-95

Настоящая фармакопейная статья распространяется на бактериофаг бактерий протея, раствор для приема внутрь, местного применения и наружного применения. Препарат представляет собой раствор, содержащий смесь очищенных бактериофагов *Proteus vulgaris* и *Proteus mirabilis* в количестве не менее 10^5 каждого вида бактериофагов в 1 мл препарата. В состав препарата входят вспомогательные вещества.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство лечебно-профилактического бактериофага бактерий протея и требования, предъявляемые к производственным штаммам, штаммам для контроля и маточным бактериофагам, должны соответствовать требованиям, изложенным в ОФС «Бактериофаги».

Контроль качества производственных штаммов должен проводиться не реже 1 раза в год.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачная жидкость желтого цвета, различной интенсивности, возможен зеленоватый оттенок. Определение проводят визуально.

Подлинность. Препарат должен специфически лизировать бактерии *P. vulgaris* и *P. mirabilis.* Подлинность препарата подтверждается его специфической активностью согласно разделу «Специфическая активность».

pH. От 6,6 до 7,8. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии ОФС «Ионометрия».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Стерильность. Препарат должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методом прямого посева или мембранной фильтрации с использованием тиогликолевой среды и жидкой среды Сабуро.

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Для контроля отбирают по 3 флакона от серии, объединяя их в общую пробу. Тест-дозу в объеме 1 мл вводят подкожно белым мышам массой 19-21 г (используют 5 животных). Срок наблюдения 48 ч. В течение предусмотренного срока наблюдения не должна погибнуть ни одна мышь.

Специфическая активность. Препарат должен лизировать бактерии

P.vulgaris и *P.mirabilis* в разведении не менее $10^{-5,}$ что соответствует содержанию фаговых частиц каждого вида бактериофагов *P. vulgaris* и *P. mirabilis* в количестве не менее 10^5 в 1 мл препарата.

Определение проводят титрованием по методу Аппельмана в соответствии с ОФС «Бактериофаги» (раздел «Специфическая активность») на питательном бульоне для культивирования микроорганизмов (МПБ) или бульоне Хоттингера.

Для контроля отбирают по 2 образца (флакона) от каждой серии. Для определения активности используют не менее 6 штаммов *P. vulgaris* и не менее 6 штаммов *P.mirabilis* из коллекции контрольных штаммов (тест-штаммов) предприятия, которые не использовались при изготовлении препарата.

Если хотя бы на одном штамме активность препарата оказывается меньше установленной (10^{-5}), контроль проводят на удвоенном количестве штаммов того же вида бактерий, который дал неудовлетворительный результат.

Препарат считают выдержавшим испытания, если лизировались не менее 75% штаммов, использованных при первом и повторном титрованиях.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». В маркировке лекарственной формы «раствор» должна быть предусмотрена предупредительная надпись «При помутнении не применять».

Транспортирование и **хранение.** В защищенном от света месте, при температуре от 2 до 8 °С в соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С в пределах одного мес.

Бактериофаг бактерий брюшного тифа, таблетки	ФС.3.3.1.0066.18 Взамен ГФ X, ст. 79, ФС 42-3245-95

Настоящая фармакопейная статья распространяется на бактериофаг бактерий брюшного тифа, таблетки с кислотоустойчивым покрытием. Препарат представляет собой лиофилизированный концентрат, содержащий очищенные бактериофаги *Salmonella typhi*. Прератат в 1 дозе содержит активное вещество - лиофилизированный концентрат очищенных бактериофагов *S.typhi* в концентрации не ниже 10^8 бляшкообразующих единиц (БОЕ) на мг для штаммов, содержащих *Vi*-антиген и 10^6 БОЕ на мг для штаммов, не содержащих *Vi*-антиген, а также вспомогательные вещества.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство лечебно-профилактического бактериофага бактерий брюшного тифа и требования, предъявляемые к производственным штаммам, штаммам для контроля и маточным бактериофагам, должны соответствовать требованиям, изложенным в ОФС «Бактериофаги».

Контроль качества производственных штаммов должен проводиться не реже 1 раза в год.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Таблетка круглой формы, диаметром 7 мм, двояковыпуклая, с гладкой поверхностью, светло-серого цвета. Определение проводят визуально.

Подлинность. Препарат должен специфически лизировать бактерии *S.typhi.* Подлинность препарата подтверждается его специфической активностью согласно разделу «Специфическая активность».

Средняя масса таблетки и отклонения от средней массы. Средняя масса таблетки от 92,5 до 107,5 мг. Определение проводят в соответствии с ОФС «Однородность массы дозирования лекарственных форм».

Время распадаемости. Не более 30 мин (без дисков). Испытание проводят визуально в соответствии с ОФС «Распадаемость таблеток и капсул».

Потеря в массе при высушивании. Не более 4 %. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании». Для анализа необходимо использовать не менее 1 г препарата.

Микробиологическая чистота. Категория 5.2 Б. Определение проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота». Для проведения испытания отбирают 20 таблеток от каждых 10000, но не менее 100 таблеток от серии.

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Для контроля отбирают по 1 таблетке из 3 флаконов от серии, объединяя их в общую пробу. Растворяют в стерильной очищенной воде из расчета 20 мл на 1 таблетку. Тест-дозу в объеме 1 мл вводят подкожно белым мышам массой 19-21 г (используют 5 животных). Срок наблюдения 48 ч, в течение которого не должна погибнуть ни одна мышь.

Специфическая активность. Препарат должен лизировать бактерии *S. typhi* в разведении не менее 10^{-7} для штаммов, содержащих *Vi*-антиген и не менее 10^{-5} для штаммов, не содержащих *Vi*--антиген.

После обработки препарата кислым буферным раствором с pH от 2,5 до 2,6 активность бактериофага не должна быть ниже 10^{-6} для штаммов, содержащих Vi-антиген и не менее 10^{-4} для штаммов, не содержащих Vi-антиген.

Определение проводят титрованием по методу Аппельмана в соответствии с методикой, изложенной в ОФС «Бактериофаги» (раздел «Специфическая активность»), используя бульон мясо-гидролизный, или питательный бульон для культивирования микроорганизмов мясопептоновый агар (МПБ) или аналогичный, или бульон Хоттингера.

При определении активности каждого приготовленного образца используют 4 штамма, содержащих *Vi*-антиген и 2 стандартных штамма, Ту-2 (4446) и О-901.

Если хотя бы на одном штамме активность препарата оказывается меньше установленной, контроль проводят на удвоенном количестве штаммов того же вида бактерий, который дал неудовлетворительный результат. Препарат считают выдержавшим испытания, если лизировались не менее 75% штаммов, использованных при первом и повторном титрованиях.

Примечание

Приготовление кислого буферного раствора**.** 21 г лимонной кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, прибавляют 200 мл 1 М раствора натрия гидроксида, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. 170 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, прибавляют 350 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты, объем раствора доводят водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор хранят при температуре от 18 до 25 ^{0} С в течение 2 мес.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Транспортирование и хранение. В защищенном от света месте, при температуре от 2 до 8 ^{o}С В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25^{o}С в пределах одного мес.

Аллерген бруцеллезный жидкий, раствор для внутрикожного введения	ФС.3.3.1.0067.18 Взамен ГФ X, ст. 114, Взамен ФС 42 - 3552-98

Настоящая фармакопейная статья распространяется на аллерген бруцеллезный жидкий, раствор для внутрикожного введения (Бруцеллин), представляющий собой полисахаридно-белковый комплекс, полученный из вакцинного штамма *Brucella abortus 19 BA* в процессе химической обработки в 0,9 % растворе натрия хлорида для инъекций. В ампуле содержится 10 внутрикожных доз, одна внутрикожная доза (0,1 мл) содержит от 3,8 до 5,4 мкг белка. Аллерген бруцеллезный жидкий не содержит консервантов и антибиотиков.

Препарат предназначен для специфической диагностики повышенной чувствительности к бруцеллам.

ПРОИЗВОДСТВО

Технология производства аллергена бруцеллезного жидкого предусматривает получение производственных посевных культур штамма *B. abortus* 19 BA I, II, III и IV генераций; процесс накопления биомассы для приготовления микробной взвеси с необходимой концентрацией; инактивацию IV генерации микробной массы бруцелл ацетоном; осаждение и высушивание микробной массы; получение гидролизата из микробной массы, выделение из гидролизата действующего вещества - полисахаридно-белкового

комплекса; очистку и лиофилизацию полуфабриката; приготовление раствора аллергена из лиофилизированного полуфабриката путем добавления 0,9 % раствора натрия хлорида до содержания белка (46±8) мкг/мл, стерилизацию в водяной бане при температуре (98±2) ^{o}C; розлив, герметизацию и маркировку ампул с препаратом.

На стадиях приготовления посевных культур проводят контроль на отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов и на отсутствие диссоциации пробой с трипафлавином (отсутствие агглютинации); определяют концентрацию микробных клеток; проводят контроль специфической стерильности инактивированной бактериальной массы бруцелл; на этапе приготовления аллергена определяют белок, pH, стерильность.

Вакцинный штамм *B. abortus* 19 BA биовар I должен иметь типичные культуральные, морфологические, биохимические и серологические свойства; не должен содержать бруцеллезного бактериофага; остаточная вирулентность для белых мышей массой 18 -20 г должна находиться в пределах инфицирующих доз ($ИД_{50}$) от $5\cdot10^2$ до $5\cdot10^5$ микробных клеток (м.к.); не должен вызывать гибель белых мышей массой 18-20 г при подкожном введении дозы $2\cdot10^9$ м.к. в течение 6 сут наблюдения; при подкожном введении морским свинкам дозы $2\cdot10^9$ м.к./мл через 14 сут должен определяться от $5\cdot10^2$ до $5\cdot10^4$ м.к./мл в 1 мл суспензии селезенки; должен предохранять от инфицирования вирулентным штаммом *B. melitensis* 565 не менее 8 из 10 морских свинок, иммунизированных подкожно $2\cdot10^9$ живых м.к./мл.

Перед приготовлением очередной серии производственной культуры вакцинного штамма *B. abortus* 19 BA проводят пассаж штамма через организм морской свинки с последующим отбором типичных колоний, выросших на плотной питательной среде из посевов селезенки или регионарных лимфатических узлов.

Работу с культурой штамма *B. abortus* 19 ВА проводят с соблюдением санитарных правил «Безопасность работы с микроорганизмами III -IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», с культурой вирулентного штамма *B. melitensis* 565 – санитарные правила «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)», действующих в РФ.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость. Определение проводят визуально.

Подлинность. Должны наблюдаться гиперемия и инфильтрат (отек) размером не менее 8 мм вокруг места при внутрикожном введении 0,1 мл аллергена морской свинке. Определение проводят биологическим методом в соответствии с разделом «Специфическая активность».

Прозрачность. Прозрачный раствор (определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей») или раствор с оптической плотностью не более 0,05 (определение проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» в кюветах с толщиной слоя 3 мм при длине волны 540 нм). Метод определения указывают в нормативной документации.

Механические включения. Должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH. От 6,8 до 7,2. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Извлекаемый объем. Должен быть не менее номинального (не менее 1,0 мл). Испытание проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Белок. От 38 до 54 мкг/мл. Определение проводят колориметрическим методом в соответствии с ОФС «Определение белка колориметрическим методом (метод Лоури) в биологических лекарственных препаратах» без предварительного осаждения белка.

Стерильность. Препарат должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методом, указанным в нормативной документации.

Специфическая стерильность. Препарат не должен содержать живых бруцелл. Специфическую стерильность проверяют высевом по 0,1 мл аллергена на чашки Петри с печеночным или картофельным агаром и на 2 пробирки с печеночным бульоном. Учет результатов проводят через 6 сут выдерживания посевов при температуре (37±1) °С. Посевы должны быть стерильными.

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Испытания проводят путем внутрибрюшинного введения по 0,1 мл 5 белым мышам массой 18-20 г и подкожного введения по 0,1 мл одной морской свинке массой 250-300 г, если нет других указаний в нормативной документации. Период наблюдения за животными составляет 7 сут.

Специфическая активность. Препарат должен вызывать на месте введения реакцию в виде гиперемии и инфильтрата (отека) размером от 8 до 14 мм при внутрикожном введении 0,1 мл аллергена иммунизированным морским свинкам.

Двух морских свинок массой 325 - 375 г иммунизируют подкожно вакциной бруцеллезной живой в дозе $2 \cdot 10^{9}$ м. к./мл шприцем вместимостью 2 мл. Через 30-40 сут иммунизированным и одной контрольной (неиммунизированной) морской свинке в центр депилированного участка кожи размером 4 х 4 см на боковой поверхности туловища, предварительно обработанной спиртом, строго внутрикожно вводят 0,1 мл аллергена.

Учет проводят через 48 ч по реакции в виде гиперемии и инфильтрата (отека) вокруг места введения аллергена. Положительной считают реакцию в виде гиперемии и инфильтрата не менее 8 мм. Отрицательной реакцией считают отсутствие кожных проявлений или наличие гиперемии и инфильтрата менее 8 мм.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С в условиях, исключающих замораживание препарата в соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Аллерген туляремийный жидкий, суспензия для накожного скарификационного применения	ФС.3.3.1.0068.18 Взамен ГФ X, ст. 708, Взамен ФС 42-3928-00

Настоящая фармакопейная статья распространяется на аллерген туляремийный жидкий (Тулярин), суспензию для накожного скарификационного применения, представляющий собой убитую нагреванием взвесь культуры вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ в 0,9 % растворе натрия хлорида.

В ампуле содержится 20 накожных доз, одна доза (0,05 мл) содержит $5 \cdot 10^8$ микробных клеток (м.к.). Препарат содержит консервант.

Препарат предназначен для определения специфического иммунитета и диагностики туляремии.

ПРОИЗВОДСТВО

Технология производства аллергена туляремийного жидкого (Тулярина) предусматривает получение производственных посевных культур *F. tularensis* 15 НИИЭГ I, II, III, IV и V генераций; накопление и разведение бактериальной массы V генерации 0,9 % раствором натрия хлорида с 3 % глицерином до необходимой концентрации; первая и вторая инактивация микробной массы V генерации при температуре (75±5) ^{o}C; разведение микробной массы 0,9 % раствором натрия хлорида до рабочей концентрации; розлив, герметизацию; инактивацию при температуре (75±5) ^{o}C и маркировку ампул с препаратом.

На стадиях приготовления производственных посевных культур проводят испытания на отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов, определяют концентрацию микробных клеток. На стадии приготовления аллергена прово-

дят анализ специфической стерильности инактивированной микробной массы и определяют концентрацию микробных клеток.

Вакцинный штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ должен иметь типичные культуральные, морфологические, биохимические и серологические свойства; остаточная вирулентность (LD_{50}) вакцинного штамма для белых мышей массой 18-20 г должна находиться в пределах от 10^2 до $2 \cdot 10^6$ живых микробных клеток (м.к.); штамм не должен вызывать гибель морской свинки при введении дозы, равной $5 \cdot 10^9$ м.к; при накожной иммунизации морских свинок дозами $5 \cdot 10^6$ и $5 \cdot 10^7$ м.к. должен вызывать появление инфильтрата и гиперемии диаметром от 5 до 15 мм; показатель иммуногенности (ED_{50}) для морских свинок должен быть не более $1 \cdot 10^3$ живых микробных клеток при инфицировании вирулентным штаммом *F. tularensis* 503/840.

Перед приготовлением производственной культуры вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ проводят его пассаж через организм морской свинки с последующим отбором типичных иммуногенных (белых) колоний, образующихся на плотной питательной среде при посеве селезенки и регионарных лимфатических узлов.

Работу с культурой штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ проводят с соблюдением санитарных правил «Безопасность работы с микроорганизмами III -IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», с культурой вирулентного штамма *F. tularensis* 503/840 – санитарных правил «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)», действующих в РФ.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Гомогенная суспензия белого цвета с сероватым или желтоватым оттенком, без посторонних включений, при отстаивании разделяющаяся на 2 слоя: верхний - бесцветная прозрачная жидкость, нижний - осадок белого цвета с сероватым или желтоватым оттенком, легко разбивающийся при встряхивании. Определение проводят визуально.

Подлинность. Должна быть чистая культура туляремийного микроба. Определение проводят прямым иммунофлуоресцентным методом с помощью иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих туляремийных сухих соответствующего года выпуска.

В мазках из препарата, окрашенных в соответствии с инструкцией по применению иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих туляремийных сухих, при просмотре не менее 30 полей зрения микробные клетки должны иметь яркое зеленовато-желтое свечение по периферии.

pH. От 6,8 до 7,2. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Извлекаемый объем. Должен быть не менее номинального (не менее 1,0 мл). Испытание проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Стерильность. Препарат должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методом, указанным в нормативной документации.

Специфическая стерильность. Аллерген не должен содержать живых клеток туляремийного микроба. Испытание проводят путем высева по 0,1 мл аллергена на одну пробирку с рыбно-дрожжевой цистеиновой питательной средой или с питательной средой для культивирования и выделения туляремийного микроба (FT-агар) и на одну пробирку с питательной средой Мак-Коя. Посевы инкубируют при температуре (37±1) °С в течение 7 сут. Посевы должны быть стерильными.

Приготовление питательных сред (рыбно-дрожжевая цистеиновая и Мак-Коя) должно быть указаны в нормативной документации.

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

Испытания проводят путем внутрибрюшинного введения по 0,5 мл 5 белым мышам массой 18-20 г и подкожного введения по 0,5 мл одной мор-

ской свинке массой 250-300 г. Период наблюдения за животными составляет 7 сут.

Специфическая активность. Концентрация микробных клеток должна составлять $9,0 \cdot 10^9$ - $10,0 \cdot 10^9$ 0,5 мл м.к./мл. Определение проводят визуально путем сравнения со стандартом мутности бактериальных взвесей 10 МЕ, эквивалентного содержанию $5 \cdot 10^9$ м.к. туляремийного микроба.

При накожном скарификационном нанесении 0,1 мл аллергена, иммунизированным морским свинкам на месте введения должна быть реакция в виде инфильтрата и гиперемии не менее 10 мм поперек сделанных насечек.

Двух морских свинок массой 375 – 425 г предварительно иммунизируют накожно вакциной туляремийной живой в дозе $2 \cdot 10^8$ живых м.к./мл. Для этого содержимое ампулы с вакциной разводят водой для инъекций в объеме, который рассчитан для накожного применения для данной серии аллергена туляремийного. Затем микробную взвесь разводят 0,9 % раствором натрия хлорида в 10 раз до концентрации $2 \cdot 10^8$ м.к./мл. На участок депилированной кожи размером 4х4 см боковой поверхности туловища, предварительно обработанной спиртом, затем эфиром, после испарения эфира наносят одноразовым шприцем 2 капли (0,1 мл) микробной взвеси, концентрацией $2 \cdot 10^8$ м.к./мл на расстоянии 23-27 мм одну от другой. Через каждую каплю оспопрививательным пером делают по 2 параллельные насечки длиной от 8 до 12 мм, которые не должны кровоточить. Нанесенную на кожу взвесь тщательно втирают в течение 1 мин плоской стороной оспопрививательного пера. Через 25-30 сут иммунизированным и одной контрольной (неиммунизированной) морской свинке ставят скарификационную кожную пробу с аллергеном. Для этого на участке депилированной кожи противоположной боковой поверхности животного, предварительно обработанной спиртом, затем эфиром, одноразовым шприцем наносят две капли аллергена (0,1 мл) на расстоянии 23-27 мм одной от другой. Через каждую каплю оспопрививательным пером делают по 2 параллельные насечки длиной 8-12 мм, которые не должны кровоточить.

Учет проводят через 48 ч по кожной реакции в виде гиперемии и инфильтрата на месте нанесения препарата. Положительной считают реакцию в виде гиперемии и инфильтрата не менее 10 мм поперек сделанных насечек. Отрицательной реакцией считают отсутствие кожных проявлений или наличие гиперемии и инфильтрата менее 10 мм поперек сделанных насечек. У контрольной морской свинки кожная реакция на месте нанесения препарата должна отсутствовать.

Вещества, входящие в состав препарата. Консервант – 3 % глицерин (расчетная величина).

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С в условиях, исключающих замораживание препарата в соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Интерферон человеческий рекомбинантный альфа-2b, субстанция раствор, раствор замороженный	ФС.3.3.1.0069.18 Вводится впервые

Аминокислотная последовательность интерферона альфа-2b:

*[M]CDLPQTHSLG SRRTLMLLAQ MR**R**ISLFSCL*
KDRHDFGFPQ EEFGNQFQKA ETIPVLHEMI
QQIFNLFSTK DSSAAWDETL LDKFYTELYQ
QLNDLEACVI QGVGVTETPL MKEDSILAVR
KYFQRITLYL KEKKYSPCAW EVVRAEIMRS
FSLSTNLQES LRSKE

Настоящая фармакопейная статья распространяется на субстанцию интерферона человеческого рекомбинантного альфа-2b, представляющего собой раствор белка, полученного с помощью технологии рекомбинантной ДНК.

Продуцентом интерферона альфа-2b являются генетически модифицированные клетки *Escherichia coli*, полученные путем трансформации исходного штамма вектором, содержащим ген интерферона альфа-2b человека.

В зависимости от особенностей технологии производства возможно наличие/отсутствие в молекуле интерферона альфа-2b N-концевого метионина *[M]*.

Субстанция предназначена для производства лекарственных препаратов.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство субстанции интерферона альфа-2b должно проводиться в условиях соблюдения правил надлежащей производственной практики и в соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные средства, получаемые методом рекомбинантной ДНК» и ОФС «Биотехнологические лекарственные препараты».

Экспрессирующая конструкция, штамм-продуцент, должны быть охарактеризованы в полном объёме и в соответствии с требованиями, изложенными в ОФС «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК». Производственные штаммы и штаммы для контроля должны быть депонированы в официальной коллекции.

При производстве субстанции должны быть предусмотрены требования и испытания микробиологической чистоты до стерилизующей фильтрации.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Раствор (или раствор после размораживания) представляет собой бесцветную или слегка желтоватую, прозрачную, опалесцирующую жидкость.

Замороженный раствор представляет собой плотную затвердевшую беловатого цвета массу. В нормативной документации должны быть указаны условия размораживания субстанции.

Подлинность. Должна представлять собой интерферон альфа – 2b типа, ее подлинность может быть подтверждена несколькими независимыми валидированными методами, среди которых обязательно должен быть биологический метод и метод пептидного картирования. Выбор методов оценки подлинности должен быть обоснован.

Биологический метод. Субстанция должна инактивироваться анти-альфа-интерфероновыми поликлональными или моноклональными антителами аналогично международному стандартному образцу активности интерферона альфа-2b (МСО) с активностью 70000 МЕ в ампуле или стандартному образцу (СО),

откалиброванному в международных единицах (МЕ) относительно международного стандартного образца. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Биологические методы испытания препаратов интерферонов с использованием культур клеток», разделом «Подлинность» по методике, указанной в нормативной документации.

Изоэлектрическое фокусирование. Положение основных полос на изоэлектрофореграмме испытуемого образца должно соответствовать положению основных полос на изоэлектрофореграмме стандартного образца. Изоэлектрическая точка должна находиться в диапазоне pH 5,8 – 6,3. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Изоэлектрическое фокусирование» по методике, указанной в нормативной документации.

Пептидное картирование. Профиль хроматограммы испытуемого раствора после ферментативного гидролиза трипсином должен принципиально соответствовать профилю хроматограммы стандартного раствора. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пептидное картирование», по методике указанной в нормативной документации.

Подлинность безметиониновой формы интерферона устанавливается по международному стандартному образцу интерферона альфа-2b - CRS.

Подлинность метиониновой формы интерферона альфа-2b - по стандартному образцу предприятия, аттестованному в установленном порядке.

Электрофорез в полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях. Положение основной полосы на электрофореграмме испытуемого раствора должно соответствовать положению основной полосы на электрофореграмме стандартного раствора интерферона альфа-2b. Испытания проводят методом электрофореза в восстанавливающих условиях в соответствии с разделом «Чистота. Метод электрофореза в восстанавливающих условиях при окрашивании нитратом серебра».

Прозрачность. Раствор (или раствор после размораживания) должен быть прозрачным или по степени мутности не должен превышать эталон I. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Прозрачность и

степень мутности жидкостей» (в случае размораживания - через 2 ч после полного размораживания субстанции).

Цветность. Раствор (или раствор после размораживания) должен быть бесцветным или выдерживать сравнение с эталоном B_9. Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей» (в случае размораживания - через 2 ч после полного размораживания субстанции).

pH. От 4,7 до 7,5. Границы установленной нормы для данного значения не должны быть более 1,0. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Белок. Не менее 1,0 мг/мл, если нет других указаний в нормативной документации. Определение проводят методом Лоури (метод А) в соответствии с требованиями ОФС «Определение белка» по методу, указанному в нормативной документации.

Стерильность. Должна быть стерильной. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Стерильность» методом прямого посева или мембранной фильтрации.

Бактериальные эндотоксины. Не более 100 ЕЭ/мг белка, если нет других указаний в нормативной документации. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины» по методу, указанному в нормативной документации.

Чистота. Оценивается двумя методами.

Электрофорез в полиакриламидном геле:

– в восстанавливающих условиях на электрофореграмме испытуемого раствора должна выявляться основная интенсивная полоса с молекулярной массой около 19000 Да, допускается присутствие дополнительных менее интенсивных полос с более низкой молекулярной массой, чем основная полоса. Ни одна из дополнительных полос не может быть более интенсивной, чем основная полоса, полученная для 1,0 % стандартного раствора, и должно быть не более трех дополнительных полос, более интенсивных, чем основная полоса, полученная для 0,2 % стандартного раствора;

– в невосстанавливающих условиях на электрофореграмме испытуемого раствора должна выявляться основная интенсивная полоса с молекулярной массой около 19000 Да, допускается присутствие дополнительных менее интенсивных полос с более высокой молекулярной массой, чем основная полоса. Ни одна из дополнительных полос не может быть более интенсивной, чем основная полоса, полученная для 1,0 % стандартного раствора, и должно быть не более трех дополнительных полос, более интенсивных, чем основная полоса, полученная для 0,2 % стандартного раствора.

Испытания проводят в соответствии с ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле». Методика должна быть указана в нормативной документации.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). На хроматограмме испытуемого раствора площадь основного пика должна составлять не менее 95 % от суммы площадей всех пиков. Площадь любого дополнительного пика должна составлять не более 3 % от суммы площадей всех пиков. Сумма площадей всех дополнительных пиков должна составлять не более 5 % от суммы площадей всех пиков. Испытания проводят методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография» в сравнении с международным стандартным образцом интерферона альфа-2b - CRS или стандартным образцом предприятия, аттестованным в установленном порядке. Используют исходный и окисленный стандартный образец, хроматографические условия и особенности методики должны быть указаны в нормативной документации.

Остаточные белки штамма продуцента. Не более 200 нг на мг белка Определение проводят иммунохимическим методом по ОФС «Метод иммуноферментного анализа». Методика должна быть указана в нормативной документации. Допускается использование набора реагентов в соответствии с инструкциями по применению.

Остаточная ДНК штамма продуцента. Не более 10 пг на1 млн МЕ, если не обосновано иное. Определение проводят одним из методов с установленным

пределом обнаружения/пределом количественного определения: методом молекулярной гибридизации с использованием ДНК-зондов, методом на основе полимеразной цепной реакции в соответствии с ОФС «Полимеразная цепная реакция» или другими валидированными методами, например, иммуноферментным методом «Threshold system». Методики испытания должны быть изложены в нормативной документации.

Аномальная токсичность. Должна быть нетоксична. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Вид животных, тест-доза, способ введения и срок наблюдения должны быть указаны в нормативной документации.

Специфическая активность. Должна быть не менее $2{,}0 \cdot 10^8$ МЕ/мл, если нет других указаний в нормативной документации. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Биологические методы испытания препаратов интерферонов с использованием культур клеток» по разделу «Специфическая активность», методика должна быть указана в нормативной документации.

Удельная активность. Расчетная величина. Не менее $1{,}4 \cdot 10^8$ МЕ антивирусной активности субстанции/мг белка, если в нормативной документации нет других указаний.

Удельную активность вычисляют путем деления значения специфической активности (МЕ/мл) на значение содержания белка (мг/мл).

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств» и ОФС «Лекарственные формы».

Транспортирование. Раствор. При температуре от 2 до 8 ºС. Замороженный раствор. При температуре не выше минус 18 ºС в течение не более 30 дней, если иное не указано в нормативной документации.

Хранение. Раствор. При температуре от 2 до 8 ºС. Замороженный раствор. При температуре не выше минус 40 ºС. После размораживания раствора допустимо его хранение при температуре от 2 до 8 ºС в течение не более 30 дней, если иное не указано в нормативной документации.

Пробиотик бактерий сенной палочки монокомпонентный, суспензия для приема внутрь	ФС.3.3.1.0070.18 Вводится впервые

Настоящая фармакопейная статья распространяется на пробиотик бактерий сенной палочки монокомпонентный, суспензия для приема внутрь. Активным компонентом препарата является биомасса живых бактерий антагонистически активного штамма *Bacillus subtilis* 534 в 0,7 % растворе натрия хлорида. В одной дозе препарата должно содержаться не менее $1 \cdot 10^9$ КОЕ споровых бактерий.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство препарата осуществляется в соответствии с требованиями, изложенными в ОФС «Пробиотики», ОФС «Споровые пробиотики» и ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков».

Контроль качества производственных пробиотических штаммов и штаммов для контроля пробиотиков проводится не реже 1 раза в год.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Гомогенная суспензия белого или светло-желтого цвета. При отстаивании образует рыхлый осадок от белого до светло-желтого цвета, разбивающийся при встряхивании. Определение проводят визуально**.**

Подлинность. В мазках, окрашенных по Цилю-Нильсену, должны присутствовать споры, окрашенные в розовый цвет. Испытание проводят микроскопически в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков». Подлинность подтверждается специфической активностью (раздел «Специфическая активность»).

pH. От 6,0 до 8,0. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем».

Специфическая безвредность. Препарат должен быть безвреден для белых мышей при пероральном введении одной дозы (1 мл). Определение проводят в соответствии с ОФС «Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo*».

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов (микробиологическая чистота). Категория 5.3.А.

Определение проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

Специфическая активность. В одной дозе препарата должно содержаться не менее $1 \cdot 10^9$ КОЕ споровых бактерий, показатели антагонистической активности должны быть не ниже 10 мм. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков».

Определение количества живых бактериальных клеток в 1 дозе проводят методом последовательных десятикратных разведений в 0,9 % растворе натрия хлорида с последующим высевом на среду Гаузе № 2. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков» (метод Коха).

Показатели антагонистической активности определяют методом отсроченного антагонизма на среде Гаузе № 2, выражая в миллиметрах зоны задержки роста тест-штаммов *Staphylococcus aureus* «Никифоров», *Staphylococcus aureus* «Филиппов», *Escherichia.coli* 157, *Proteus vulgaris* 24а.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Транспортирование и **хранение.** В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств» при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте. Допускается транспортирование при температуре 25 °С не более 10 сут.

Пробиотик бифидобактерий бифидум монокомпонентный, таблетки	ФС.3.3.1.0071.18 Взамен ФС 42-3449-97

Настоящая фармакопейная статья распространяется на биотехнологический лекарственный препарат (БтЛП), пробиотик бифидобактерий бифидум монокомпонентный, таблетки. Активным компонентом пробиотика является биомасса живых антагонистически активных бактерий штамма *Bifidobacterium bifidum* 1 или *Bifidobacterium bifidum* 791. В одной дозе препарата должно содержаться не менее 10^7 КОЕ бифидобактерий.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство препарата должно осуществляться в соответствие с требованиями, изложенными в ОФС «Бифидосодержащие пробиотики», ОФС «Пробиотики» и ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков».

Контроль качества производственных пробиотических штаммов и штаммов для контроля пробиотиков проводится не реже 1 раза в год.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Таблетки беловато-серого или желтовато-серого или разных оттенков бежевого цвета, допускается «мраморность» окраски, имеют круглую форму с плоскими или слегка выпуклыми гладкими поверхностями, со специфическим запахом. Определение проводят органолептически.

Подлинность. В мазках, окрашенных по Граму, должны присутствовать грамположительные полиморфные палочки с бифуркацией на одном или двух концах, длиной 4-5 мкм, располагающиеся в виде скоплений или отдельных

клеток. Испытание проводят микроскопически в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков».

Подлинность подтверждается специфической активностью (раздел «Специфическая активность»).

Время распадаемости. Не более 30 мин. Одну таблетку препарата помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл и добавляют 50 мл воды очищенной, прогретой до температуры (37±1) ^{o}C. При покачивании колбы на шуттель-аппарате с частотой 1-2 Гц таблетка должна распадаться на мелкие кусочки или рыхлую массу желтовато-серого или разных оттенков бежевого цвета.

pH. От 5,5 до 7,0. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия», ОФС «Бифидосодержащие пробиотики» и ОФС «Пробиотики». При проведении испытаний лекарственного препарата с дозировкой 1 доза/табл используют не менее 20 таблеток, лекарственного препарата с дозировкой 5 доз/табл – не менее 10 таблеток. Препарат разводят 0,9 % раствором натрия хлорида из расчета 1 мл на 1 дозу.

Потеря в массе при высушивании. Не более 4,5 %. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании» или другим валидированным методом.

Средняя масса и отклонение от средней массы. Нормативные требования должны быть указаны в Нормативной документации производителя. Определение проводят в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

Специфическая безвредность. Препарат должен быть безвреден для белых мышей при пероральном введении одной таблетки. Определение проводят в соответствии с ОФС «Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo*.

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов (микробиологическая чистота). Категория 5.3.Б. Определение в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота», раздел 11.

Специфическая активность. В одной дозе препарата должно содержаться не менее 10^{7} КОЕ бифидобактерий, показатель активности кислотооб-

разования должен быть не ниже 90 °Т. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков».

Определение количества живых бактериальных клеток в 1 дозе проводят методом последовательных десятикратных разведений в 0,9 % растворе натрия хлорида с последующим высевом в модифицированную печеночную среду Блаурокка. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков» (Пробирочный метод учета колоний в полужидкой среде).

Показатель активности кислотообразования определяют методом кислотно-основного титрования (титриметрический метод). Для выращивания бифидобактерий используют модифицированную печеночную среду Блаурокка.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Транспортирование и **хранение.** При температуре от 2 до 8 °С в соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Пробиотик лактобактерий монокомпонентный, таблетки	ФС.3.3.1.0072.18 Взамен ФС 42-3241-95

Настоящая фармакопейная статья распространяется на пробиотик лактобактерий монокомпонентный, таблетки. Активным компонентом пробиотика является биомасса живых антагонистически активных бактерий штаммов *Lactobacillus plantarum* 8Р-А3 или *Lactobacillus fermentum* 90Т-С4. В одной таблетке (дозе) препарата должно содержаться не менее $2 \cdot 10^9$ КОЕ лактобактерий.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство препарата должно осуществляться в соответствие с требованиями, изложенными в ОФС «Лактосодержащие пробиотики», ОФС «Пробиотики» и ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков».

Контроль качества производственных пробиотических штаммов и штаммов для контроля пробиотиков проводится не реже 1 раза в год.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Таблетки от желтовато-серого до бежевого цвета, допускается «мраморность» окраски, имеют круглую форму с плоскими или слегка выпуклыми поверхностями со специфическим запахом. Определение проводят органолептически.

Подлинность. В мазках, окрашенных по Граму, должны присутствовать грамположительные прямые палочки длиной от 0,7 до 3,0 мкм, располагающиеся беспорядочными скоплениями или отдельными короткими цепочками. Испытание проводят микроскопически в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков».

Подлинность подтверждается специфической активностью (раздел «Специфическая активность»).

Время распадаемости. Не более 70 мин. Одну таблетку препарата помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл и добавляют 50 мл воды очищенной, прогретой до температуры (37±1) ^{o}C. При покачивании колбы на шуттель-аппарате с частотой 1-2 Гц таблетка должна распадаться на мелкие кусочки или рыхлую массу желтовато-серого или разных оттенков бежевого цвета.

pH. От 5,0 до 7,0. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия». При проведении испытаний лекарственного препарата с дозировкой 1 доза/табл используют не менее 20 таблеток. Препарат разводят 0,9 % раствором натрия хлорида из расчета 1 мл на 1 дозу.

Потеря в массе при высушивании. Не более 4,5 %. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании» или другим валидированным методом.

Средняя масса и отклонение от средней массы. Нормативные требования должны быть указаны в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

Специфическая безвредность. Препарат должен быть безвреден для белых мышей при пероральном введении одной таблетки (дозы).

Определение проводят в соответствии с ОФС «Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo*». Тест-доза испытуемого препарата содержится в объеме 0,5 мл на животное.

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов (микробиологическая чистота). Категория 5.3.Б. Определение проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

Специфическая активность. В одной дозе препарата должно содержаться не менее $2 \cdot 10^9$ КОЕ лактобактерий, показатель активности кислотообразования должен быть не ниже 200 °Т. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков».

Определение количества живых бактериальных клеток в 1 дозе (таблетке) проводят методом последовательных десятикратных разведений в 0,9 % растворе натрия хлорида с последующим высевом на среду МРС-4. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков» (метод Коха).

Показатель активности кислотообразования определяют методом кислотно-основного титрования (титриметрический метод). Для выращивания лактобактерий используют среду МРС-1.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Транспортирование и **хранение.** При температуре от 2 до 8 °С в соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Пробиотик лактобактерий ацидофильных поликомпонентный, таблетки	ФС.3.3.1.0073.18 Взамен ФС 42-430ВС-94

Настоящая фармакопейная статья распространяется на пробиотик лактобактерий ацидофильных поликомпонентный, таблетки. Активным компонентом пробиотика является биомасса живых антагонистически активных бактерий штаммов *Lactobacillus acidophilus* 100 аш, *Lactobacillus acidophilus* NK_1 и *Lactobacillus acidophilus* $К_3Ш_{24}$. В одной дозе препарата должно содержаться не менее 10^7 КОЕ лактобактерий ацидофильных.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство препарата должно осуществляться в соответствии с требованиями, изложенными в ОФС «Лактосодержащие пробиотики», ОФС «Пробиотики» и ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков».

Контроль качества производственных пробиотических штаммов и штаммов для контроля пробиотиков проводится не реже 1 раза в год.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Таблетки желтовато-серого или разных оттенков бежевого цвета, допускается «мраморность» окраски, имеют круглую форму с плоскими или слегка выпуклыми гладкими поверхностями, со специфическим запахом. Определение проводят органолептически.

Подлинность. В мазках, окрашенных по Граму, должны присутствовать грамположительные прямые бесспоровые палочки, располагающиеся поодиночке или в виде цепочек по 2-4 и более клеток. Испытание проводят микроскопически в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков».

Подлинность подтверждается специфической активностью (раздел «Специфическая активность»).

Время распадаемости. Не более 30 мин. Одну таблетку препарата помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл и добавляют 50 мл воды очищенной, прогретой до температуры (37±1) ^{o}C. При покачивании колбы на шуттель-аппарате с частотой 1-2 Гц таблетка должна распадаться на мелкие кусочки или рыхлую массу желтовато-серого или разных оттенков бежевого цвета.

Потеря в массе при высушивании. Не более 4,5 %. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании» или другим валидированным методом.

Средняя масса и отклонение от средней массы. Нормативные требования должны быть указаны в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

Специфическая безвредность. Должен быть безвреден для белых мышей при пероральном введении одной таблетки.

Определение проводят в соответствии с ОФС «Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo*». Тест-доза испытуемого препарата вводится в объеме 0,5 мл на одно животное.

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов (микробиологическая чистота). Категория 5.3.Б. Определение проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

Специфическая активность. В одной дозе препарата должно содержаться не менее 10^7 КОЕ лактобактерий ацидофильных, показатель активности

кислотообразования должен быть не ниже 200 °Т. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков».

Определение количества живых бактериальных клеток в 1 дозе проводят методом последовательных десятикратных разведений в 0,9 % растворе натрия хлорида с последующим высевом в обезжиренное стерильное молоко. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков» (пробирочный метод наиболее вероятных чисел).

Показатель активности кислотообразования определяют методом кислотно-основного титрования (титриметрический метод). Для выращивания лактобактерий ацидофильных используют стерильное обезжиренное молоко.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Транспортирование и **хранение.** При температуре от 2 до 8 °С в соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Пробиотик споровых бактерий поликомпонентный, таблетки	ФС.3.3.1.0074.18 Вводится впервые

Настоящая фармакопейная статья распространяется на пробиотик споровых бактерий поликомпонентный, таблетки. Активным компонентом пробиотика является биомасса живых антагонистически активных бактерий штаммов *Bacillus subtilis 3* и *Bacillus licheniformis 31.* В одной дозе препарата должно содержаться *Bacillus subtilis 3* от $1 \cdot 10^9$ до $8 \cdot 10^9$ и *Bacillus licheniformis 31* от $0{,}1 \cdot 10^9$ до $2 \cdot 10^9$ КОЕ споровых бактерий.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство препарата осуществляется в соответствии с требованиями, изложенными в ОФС «Пробиотики», ОФС «Споровые пробиотики» и ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков».

Контроль качества производственных пробиотических штаммов и штаммов для контроля пробиотиков проводится не реже 1 раза в год.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Таблетки беловато-серого до бежевого цвета, допускается «мраморность» окраски, имеют круглую форму с плоскими или слегка выпуклыми поверхностями, диаметром 6, 9 или 12 мм, со специфическим запахом. Определение проводят органолептически.

Подлинность. В мазках, окрашенных по Цилю-Нильсену, должны присутствовать вегетативные клетки синего цвета и розовые споры. Испытание проводят микроскопически в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков».

Подлинность подтверждается специфической активностью (раздел «Специфическая активность»).

Время распадаемости. Не более 20 мин. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Распадаемость таблеток и капсул».

pH. От 5,5 до 7,0. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия». При проведении испытаний лекарственного препарата с дозировкой 1 доза/табл используют не менее 20 таблеток, лекарственного препарата с дозировкой 2 дозы/табл – не менее 10 таблеток. Препарат разводят 0,9 % раствором натрия хлорида из расчета 1 мл на 1 дозу.

Потеря в массе при высушивании. Не более 4,5%. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании» или другим валидированным методом.

Средняя масса и отклонение от средней массы. Определение проводят в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

Специфическая безвредность. Препарат должен быть безвреден для белых мышей при пероральном введении одной таблетки.

Определение проводят в соответствии с ОФС «Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo*». Тест доза испытуемого препарата содержится в объеме 0,5 мл на животное.

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов (микробиологическая чистота). Категория 5.3.Б. Определение проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

Специфическая активность. В одной дозе препарата должно содержаться *B. subtilis 3* от $1 \cdot 10^9$ до $8 \cdot 10^9$ КОЕ и *B. licheniformis 31* от $0{,}1 \cdot 10^9$ до $2 \cdot 10^9$ КОЕ споровых бактерий, показатели антагонистической активности должены быть не ниже: *Shigella sonnei* и *Salmonella typhimurium* – 10 мм, *Staphylococcus aureus* - 15 мм, *Candida albicans* – 12 мм . Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков».

Определение количества живых бактериальных клеток в 1 дозе проводят методом последовательных десятикратных разведений в 0,9 % растворе натрия хлорида с последующим высевом на среду Гаузе № 2. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков» (метод Коха).

Показатели антагонистической активности определяют методом отсроченного антагонизма на среде Гаузе №2, выражая в миллиметрах зоны задержки роста тест-штаммов *S.sonnei* 5063, *S.typhimurium* 55, *S.aureus* ATCC 6538-P и *Candida albicans* ATCC 10231 или *C.albicans* NCTC 885-653.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Транспортирование и **хранение.** При температуре от 2 до 8 ^{o}C в соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Пробиотик бифидобактерий бифидум монокомпонентный, суппозитории вагинальные и ректальные	ФС.3.3.1.0075.18 Взамен ФС 42-3240-95

Настоящая фармакопейная статья распространяется на пробиотик бифидобактерий бифидум монокомпонентный, суппозитории вагинальные и ректальные. Активным компонентом пробиотика является биомасса живых антагонистически активных бактерий штамма *Bifidobacterium bifidum* № 1 или *Bifidobacterium bifidum* № 791. В одном суппозитории (дозе) препарата должно содержаться не менее 10^7 КОЕ бифидобактерий.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство препарата должно осуществляться в соответствие с требованиями, изложенными в ОФС «Бифидосодержащие пробиотики», ОФС «Пробиотики» и ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков».

Контроль качества производственных пробиотических штаммов и штаммов для контроля пробиотиков проводится не реже 1 раза в год.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Суппозитории белого, желтовато-серого, светло-желтого с коричневым оттенком или разных оттенков бежевого цвета, торпедовидной, ко-

нусообразной или цилиндрической формы со специфическим запахом жира; допускается неоднородность цвета в виде вкраплений или «мраморности», возможно окрашивание кончика суппозитория от бледно-желтого до светло-коричневого цвета. Определение проводят органолептически.

Подлинность. В мазках, окрашенных по Граму, должны присутствовать грамположительные полиморфные палочки с бифуркацией на одном или двух концах, длиной 4-5 мкм, располагающиеся в виде скоплений или отдельных клеток. Испытание проводят микроскопически в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков».

Подлинность подтверждается специфической активностью (раздел «Специфическая активность»).

Время полной деформации. Не более 20 мин. Один суппозиторий помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл и добавляют 50 мл воды, прогретой до температуры (37±1) °С, колбу выдерживают в термостате при температуре (37±1) °С.

Средняя масса и отклонение от средней массы. Масса суппозиториев от 1,1 до 2,0 г. Отклонение от средней массы внутри одной серии:

18/20 - не более ±5 %,

2/20 - не более ±7,5 %.

Суппозитории взвешивают с точностью до 0,001 г. Определение проводят в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

Специфическая безвредность. Должен быть безвреден для белых мышей при пероральном введении одного суппозитория (дозы).

Определение проводят в соответствии с ОФС «Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo*». Тест доза испытуемого препарата содержится в объеме 1 мл на животное.

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов (микробиологическая чистота). Категория 5.3.Б. Определение на отсутствие посторонних

микроорганизмов и грибов проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

Специфическая активность. В одном суппозитории (дозе) препарата должно содержаться не менее 10^7 КОЕ бифидобактерий, показатель активности кислотообразования должен быть не ниже 90 °Т. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков».

Определение количества живых бактериальных клеток в 1 суппозитории (дозе) проводят методом последовательных десятикратных разведений в 0,9 % растворе натрия хлорида с последующим высевом в модифицированную печеночную среду Блаурокка. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков» (пробирочный метод учета колоний в полужидкой среде).

Показатель активности кислотообразования определяют методом кислотно-основного титрования (титриметрический метод). Для выращивания бифидобактерий используют модифицированную печеночную среду Блаурокка.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Транспортирование и **хранение.** При температуре от 2 до 8 °С в соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Пробиотик лактобактерий ацидофильных поликомпонентный, суппозитории вагинальные

ФС.3.3.1.0076.18

Взамен ВФС 42-2941-97

Настоящая фармакопейная статья распространяется пробиотик лактобактерий ацидофильных поликомпонентный, суппозитории вагинальные. Активным компонентом пробиотика является биомасса живых антагонистически активных бактерий штаммов *Lactobacillus acidophilus* 100 аш, *Lactobacillus acidophilus* NK_1 и *Lactobacillus acidophilus* $К_3Ш_{24}$. В одном суппозитории (дозе) препарата должно содержаться не менее 10^7 КОЕ лактобактерий ацидофильных.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство препарата должно осуществляться в соответствие с требованиями, изложенными в ОФС «Лактосодержащие пробиотики», ОФС «Пробиотики» и ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков».

Контроль качества производственных пробиотических штаммов и штаммов для контроля пробиотиков проводится не реже 1 раза в год.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Суппозитории желтовато-серого или разных оттенков бежевого цвета, конусообразной, торпедообразной или цилиндрической формы; до-

пускается специфический запах жира и неоднородность цвета в виде вкраплений или «мраморности», возможно окрашивание кончика суппозитория от бледно-желтого до светло-коричневого цвета. Определение проводят органолептически.

Подлинность. В мазках, окрашенных по Граму, должны присутствовать грамположительные прямые бесспоровые палочки, располагающиеся поодиночке или в виде цепочек по 2-4 и более клеток. Испытание проводят микроскопически в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков».

Подлинность подтверждается специфической активностью (раздел «Специфическая активность»).

Время полной деформации. Не более 20 мин. Один суппозиторий помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл и добавляют 50 мл воды очищенной, прогретой до температуры (37±1) ^{o}C, колбу выдерживают в термостате при температуре (37±1) °С, время полной деформации не должно превышать 20 мин.

Средняя масса и отклонение от средней массы. Масса суппозиториев от 1,1 до 2,0 г. Отклонение от средней массы внутри одной серии:

18/20 – не более ±5 %,

2/20 – не более ±7,5%.

Суппозитории взвешивают с точностью до 0,001 г. Определение проводят в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

Специфическая безвредность. Должен быть безвреден для белых мышей при пероральном введении одного суппозитория (дозы).

Определение проводят в соответствии с ОФС «Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo*». Тест доза испытуемого препарата содержится в объеме 1 мл на животное.

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов (микробиологическая чистота). Категория 5.3.Б. Определение проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота» методом прямого посева.

Специфическая активность. В одном суппозитории (дозе) препарата должно содержаться не менее 10^7 КОЕ лактобактерий ацидофильных, показатель активности кислотообразования должен быть не ниже 200 °Т. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков».

Определение количества живых бактериальных клеток в 1 суппозитории (дозе) проводят методом последовательных десятикратных разведений в 0,9 % растворе натрия хлорида с последующим высевом в обезжиренное стерильное молоко. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков» (пробирочный метод наиболее вероятных чисел).

Показатель активности кислотообразования определяют методом кислотно-основного титрования (титриметрический метод). Для выращивания лактобактерий ацидофильных используют стерильное обезжиренное молоко.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Транспортирование и **хранение.** При температуре от 2 до 8 °С в соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Пробиотик лактобактерий монокомпонентный, суппозитории вагинальные	ФС.3.3.1.0077.18 Взамен ФС 42-3950-00

Настоящая фармакопейная статья распространяется на пробиотик лактобактерий монокомпонентный, суппозитории вагинальные. Активным компонентом препарата является биомасса живых антагонистически активных бактерий штамма *Lactobacillus plantarum* 8Р-А3 или *Lactobacillus fermentum* 90Т-С4. В одном суппозитории (дозе) препарата должно содержаться не менее 10^7 КОЕ лактобактерий.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство препарата должно осуществляться в соответствие с требованиями, изложенными в ОФС «Лактосодержащие пробиотики», ОФС «Пробиотики» и ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков».

Контроль качества производственных пробиотических штаммов и штаммов для контроля пробиотиков проводится не реже 1 раза в год.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Суппозитории от белого до светло-бежевого цвета, торпедовидной или цилиндрической формы; допускается неоднородность цвета в виде вкраплений или «мраморности». Определение проводят визуально.

Подлинность. В мазках, окрашенных по Граму, должны присутствовать грамположительные прямые палочки длиной от 0,7 до 3,0 мкм, располагающи-

еся беспорядочными скоплениями или отдельными короткими цепочками. Испытание проводят микроскопически в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков».

Подлинность подтверждается специфической активностью (раздел «Специфическая активность»).

Время полной деформации. Не более 20 мин. Один суппозиторий помещают в коническую колбу вместимостью100 мл и добавляют 50 мл воды, прогретой до температуры (37±1) °С, колбу выдерживают в термостате при температуре (37±1) °С.

Средняя масса и отклонение от средней массы. Масса суппозиториев от 1,1 до 2,0 г. Отклонение от средней массы внутри одной серии:

18/20 - не более ±5 %,

2/20 - не более ±7,5 %.

Суппозитории взвешивают с точностью до 0,01 г. Определение проводят в соответствии с ОФС «Однородность массы дозирования лекарственных форм».

Специфическая безвредность. Должен быть безвреден для белых мышей при пероральном введении одного суппозитория (дозы).

Определение проводят в соответствии с ОФС «Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo*». Тест доза испытуемого препарата содержится в объеме 1 мл на одно животное.

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов (микробиологическая чистота). Категория 5.3.Б.

Определение проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота» методом прямого посева.

Специфическая активность. В одном суппозитории (дозе) препарата должно содержаться не менее 10^7 КОЕ лактобактерий, показатель активности кислотообразования должен быть не ниже 200 °Т. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков».

Определение количества живых бактериальных клеток в 1 суппозитории (дозе) проводят методом последовательных десятикратных разведений в 0,9 % растворе натрия хлорида с последующим высевом в полужидкую среду МРС-2. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков» (Пробирочный метод учета колоний в полужидкой среде).

Показатель активности кислотообразования определяют титриметрическим методом, для выращивания лактобактерий используют среду МРС-1.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Транспортирование и **хранение.** При температуре от 2 до 8 ^{o}С в соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Бактериофаг бактерий кишечной палочки монокомпонентный, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения	ФС.3.3.1.0078.18 Взамен ФС 42-3237-95

Настоящая фармакопейная статья распространяется на бактериофаг бактерий кишечной палочки монокомпонентный, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения. Препарат представляет собой раствор, содержащий очищенные бактериофаги, обладающие литической активностью в отношении патогенных бактерий *Escherichia coli* (с активностью по Аппельману– не менее 10^{-5}).

В состав препарата входят вспомогательные вещества.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство лечебно-профилактического бактериофага бактерий кишечной палочки и требования, предъявляемые к производственным штаммам, штаммам для контроля и маточным бактериофагам, должны соответствовать требованиям, изложенным в ОФС «Бактериофаги».

Контроль качества производственных штаммов должен проводиться не реже 1 раза в год.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачная жидкость желтого цвета, различной

интенсивности, возможен зеленоватый оттенок. Определение проводят визуально.

Подлинность. Препарат должен специфически лизировать бактерии *E. coli.* Подлинность препарата подтверждается его специфической активностью согласно разделу «Специфическая активность».

pH. От 6,6 до 7,8. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии ОФС «Ионометрия».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем».

Стерильность. Препарат должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методом прямого посева или мембранной фильтрации с использованием тиогликолевой среды и жидкой среды Сабуро.

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Для контроля отбирают по 3 образца, объединяя их в общую пробу. Тест-дозу в объеме 1 мл вводят подкожно 5 белым мышам массой 19-21 г. Срок наблюдения 48 ч. В течение предусмотренного срока наблюдения не должна погибнуть ни одна мышь.

Специфическая активность. Препарат должен лизировать бактерии *E. coli* в разведении не менее 10^{-5}. Определение проводят титрованием по методу Аппельмана в соответствии с методикой, изложенной в ОФС «Бактериофаги» (раздел «Специфическая активность»). Для контроля отбирают по 2 образца.

Для определения используют не менее 12 штаммов *E. coli* разных серогрупп из коллекции контрольных штаммов (тест-штаммов) предприятия.

Если хотя бы на одном штамме активность препарата оказывается меньше установленной (10^{-5}), контроль проводят на удвоенном количестве штаммов того же вида бактерий, который дал неудовлетворительный результат. Препарат считают выдержавшим испытания, если лизировались не менее 75 %

штаммов, использованных при первом и повторном титрованиях.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». В маркировке лекарственной формы «раствор» должна быть предусмотрена предупредительная надпись «При помутнении не применять».

Транспортирование и **хранение.** В защищенном от света месте, при температуре от 2 до 8 °С в соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С не более 1 мес.

Бактериофаг бактерий кишечной палочки + протея поликомпонентный, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения	ФС.3.3.1.0079.18 Взамен ФС 42-3486-98

Настоящая фармакопейная статья распространяется на бактериофаг бактерий кишечной палочки + протея поликомпонентного, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения.

Препарат представляет собой раствор, содержащий очищенные бактериофаги, обладающие литической активностью в отношении бактерий *Proteus vulgaris, Proteus mirabilis* (с активностью по Аппельману – не менее 10^{-5}) и энтеропатогеннных *Escherichia coli* различных серогрупп (с активностью по Аппельману – не менее 10^{-4}).

В состав препарата входят вспомогательные вещества.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство лечебно-профилактического бактериофага и требования, предъявляемые к производственным штаммам, штаммам для контроля и маточным бактериофагам, должны соответствовать требованиям, изложенным в ОФС «Бактериофаги».

Контроль качества производственных штаммов должен проводиться не реже 1 раза в год.

ИСПЫТАНИЕ

Описание. Прозрачная жидкость желтого цвета, различной интенсивности, возможен зеленоватый оттенок. Определение проводят визуально.

Подлинность. Препарат должен специфически лизировать бактерии *P. vulgaris, P. mirabilis, E. coli.* Подлинность препарата подтверждается его специфической активностью согласно разделу «Специфическая активность».

pH. От 6,6 до 7,8. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии ОФС «Ионометрия».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем».

Стерильность. Препарат должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методом прямого посева или мембранной фильтрации с использованием тиогликолевой среды и жидкой среды Сабуро.

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Для контроля отбирают по 3 образца, объединяя их в общую пробу. Тест-дозу в объеме 1 мл вводят подкожно 5 белым мышам массой 19-21 г. Срок наблюдения 48 ч. В течение предусмотренного срока наблюдения не должна погибнуть ни одна мышь.

Специфическая активность. Препарат должен лизировать бактерии в разведении не менее: 10^{-5} для *P. vulgaris, P. mirabilis*; 10^{-4} для *E. coli*.

Определение активности проводят титрованием по методу Аппельмана в соответствии с ОФС «Бактериофаги» (раздел «Специфическая активность») на жидких питательных средах: питательном бульоне для культивирования микроорганизмов (МПБ) или аналогичном или бульоне Хоттингера, или мясо-гидролизном бульоне.

Для контроля отбирают по 2 флакона от каждой серии. Для определения активности используют по 6 штаммов бактерий *P. vulgaris* и *P. mirabilis* и не

менее 12 штаммов энтеропатогенных *E. coli* различных серогрупп из коллекции контрольных штаммов (тест-штаммов) предприятия.

Если хотя бы на одном штамме активность препарата оказывается меньше установленной, контроль проводят на удвоенном количестве штаммов того же вида бактерий, который дал неудовлетворительный результат. Препарат считают выдержавшим испытания, если лизировались не менее 75% штаммов, использованных при первом и повторном титрованиях.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». В маркировке лекарственной формы «раствор» должна быть предусмотрена предупредительная надпись «При помутнении не применять».

Транспортирование и **хранение.** В защищенном от света месте, при температуре от 2 до 8 °С в соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С не более 1 мес.

Бактериофаг бактерий синегнойной палочки монокомпонентный, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения	ФС.3.3.1.0080.18 Взамен ФС 42-3239-95

Настоящая фармакопейная статья распространяется на бактериофаг бактерий синегнойной палочки монокомпонентный, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения.

Препарат представляет собой стерильный раствор, содержащий очищенные бактериофаги, обладающие литической активностью в отношении бактерий *Pseudomonas aeruginosa* (с активностью по Аппельману – не менее 10^{-5}). В состав препарата входят вспомогательные вещества, указанные в нормативной документации.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство лечебно-профилактического бактериофага бактерий синегнойной палочки и требования, предъявляемые к производственным штаммам, штаммам для контроля и маточным бактериофагам, должны соответствовать требованиям, изложенным в ОФС «Бактериофаги».

Контроль качества производственных штаммов должен проводиться не реже 1 раза в год.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачная жидкость желтого цвета, различной интенсивности, возможен зеленоватый оттенок. Определение проводят визуально.

Подлинность. Препарат должен специфически лизировать бактерии *P. aeruginosa.* Подлинность препарата подтверждается его специфической активностью согласно разделу «Специфическая активность».

pH. От 6,6 до 7,8. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии ОФС «Ионометрия».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем».

Стерильность. Препарат должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методом прямого посева или мембранной фильтрации с использованием тиогликолевой среды и жидкой среды Сабуро.

В условиях испытания препарат не должен обладать антимикробным действием. Указания по его устранению вместе с информацией о методе испытания на стерильность, указывают в нормативной документации.

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Для контроля отбирают по 3 образца, объединяя их в общую пробу. Тест-дозу в объеме 1 мл вводят подкожно 5 белым мышам массой 19-21 г. Срок наблюдения 48 ч. В течение предусмотренного срока наблюдения не должна погибнуть ни одна мышь.

Специфическая активность. Препарат должен лизировать бактерии *P. aeruginosa* в разведении не менее 10^{-5}.

Определение активности проводят титрованием по методу Аппельмана в соответствии с ОФС «Бактериофаги» (раздел «Специфическая активность»). Для контроля отбирают по 2 образца.

Для определения активности используют 10 штаммов бактерий *P.*

aeruginosa из коллекции контрольных штаммов (тест-штаммов) предприятия.

Если хотя бы на одном штамме активность препарата оказывается меньше установленной, контроль проводят на удвоенном количестве штаммов того же вида бактерий, который дал неудовлетворительный результат. Препарат считают выдержавшим испытания, если лизировались не менее 75% штаммов, использованных при первом и повторном титрованиях.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». В маркировке лекарственной формы «раствор» должна быть предусмотрена предупредительная надпись «При помутнении не применять».

Транспортирование и **хранение.** В защищенном от света месте, при температуре от 2 до 8 °С в соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С в течение срока, не превышающего 1 мес.

Бактериофаг бактерий стафилококка монокомпонентный, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения	ФС.3.3.1.0081.18 Взамен ФС 42-3235-95

Настоящая фармакопейная статья распространяется на бактериофаг бактерий стафилококка монокомпонентный, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения.

Препарат представляет собой раствор, содержащий очищенные бактериофаги, обладающие литической активностью в отношении бактерий рода *Staphylococcus* (с активностью по Аппельману – не менее 10^{-5}). В состав препарата входят вспомогательные вещества.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство лечебно-профилактического бактериофага бактерий стафилококка и требования, предъявляемые к производственным штаммам, штаммам для контроля и маточным бактериофагам, должны соответствовать требованиям, изложенным в ОФС «Бактериофаги».

Контроль качества производственных штаммов должен проводиться не реже 1 раза в год.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачная жидкость желтого цвета, различной степени

интенсивности, допускается зеленоватый оттенок. Определение проводят визуально.

Подлинность. Препарат должен специфически лизировать бактерии *Staphylococcus.* Подлинность препарата подтверждается его специфической активностью согласно разделу «Специфическая активность».

pH. От 6,6 до 7,8. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии ОФС «Ионометрия».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем».

Стерильность. Препарат должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методом прямого посева или мембранной фильтрации с использованием тиогликолевой среды и жидкой среды Сабуро.

В условиях испытания препарат не должен обладать антимикробным действием. Указания по его устранению вместе с информацией о методе испытания на стерильность, указывают в нормативной документации.

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Для контроля отбирают по 3 образца, объединяя их в общую пробу. Тест-дозу в объеме 1 мл вводят подкожно 5 белым мышам массой 19-21 г. Срок наблюдения 48 ч. В течение предусмотренного срока наблюдения не должна погибнуть ни одна мышь.

Специфическая активность. Препарат должен лизировать бактерии *Staphylococcus* в разведении не менее 10^{-5}.

Определение специфической активности проводят титрованием по методу Аппельмана в соответствии с ОФС «Бактериофаги» (раздел «Специфическая активность»). Для контроля отбирают по 2 образца. Для определения активности используют 10 штаммов бактерий *Staphylococcus* из коллекции контрольных штаммов (тест-штаммов) предприятия.

Если хотя бы на одном штамме активность препарата оказывается

меньше установленной, контроль проводят на удвоенном количестве штаммов того же вида бактерий, который дал неудовлетворительный результат. Препарат считают выдержавшим испытания, если лизировались не менее 75% штаммов, использованных при первом и повторном титрованиях.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». В маркировке лекарственной формы «раствор» должна быть предусмотрена предупредительная надпись «При помутнении не применять».

Транспортирование и **хранение.** В защищенном от света месте, при температуре от 2 до 8 °С в соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С в течение срока, не превышающего 1 мес.

Бактериофаг бактерий стрептококка монокомпонентный, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения	ФС.3.3.1.0082.18 Взамен ФС 42-3243-95

Настоящая фармакопейная статья распространяется на бактериофаг бактерий стрептококка монокомпонентный, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения. Препарат представляет собой стерильный раствор, содержащий очищенные бактериофаги, обладающие литической активностью в отношении бактерий рода *Streptococcus* (с активностью по Аппельману – не менее 10^{-5}).

В состав препарата входят вспомогательные вещества.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство лечебно-профилактического бактериофага бактерий стрептококка и требования, предъявляемые к производственным штаммам, штаммам для контроля и маточным бактериофагам, должны соответствовать требованиям, изложенным в ОФС «Бактериофаги».

Контроль качества производственных штаммов должен проводиться не реже 1 раза в год.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачная жидкость желтого цвета, различной интенсивности, возможен зеленоватый оттенок. Определение проводят визуально.

Подлинность. Препарат должен специфически лизировать бактерии рода *Streptococcus.* Подлинность препарата подтверждается его специфической активностью согласно разделу «Специфическая активность».

pH. От 6,6 до 7,8. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии ОФС «Ионометрия».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем».

Стерильность. Препарат должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методом прямого посева или мембранной фильтрации с использованием тиогликолевой среды и жидкой среды Сабуро.

В условиях испытания препарат не должен обладать антимикробным действием. Указания по его устранению вместе с информацией о методе испытания на стерильность, указывают в нормативной документации.

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Для контроля отбирают по 3 образца, объединяя их в общую пробу. Тест-дозу в объеме 1 мл вводят подкожно 5 белым мышам массой 19-21 г. Срок наблюдения 48 ч. В течение предусмотренного срока наблюдения не должна погибнуть ни одна мышь.

Специфическая активность. Препарат должен лизировать бактерии рода *Streptococcus* в разведении не менее 10^{-5}. Определение проводят титрованием по методу Аппельмана в соответствии с ОФС «Бактериофаги» (раздел «Специфическая активность») на жидких питательных средах: питательном бульоне для культивирования микроорганизмов (МПБ) или аналогичном или бульоне Хоттингера. Допускается использование питательных сред с добавлением 0,4% глюкозы.

Для контроля отбирают по 2 флакона от каждой серии. Для определения активности используют 10 штаммов бактерий рода *Streptococcus* из коллекции контрольных штаммов (тест-штаммов) предприятия.

Если хотя бы на одном штамме активность препарата оказывается меньше установленной, контроль проводят на удвоенном количестве штаммов того же вида бактерий, который дал неудовлетворительный результат. Препарат считают выдержавшим испытания, если лизировались не менее 75% штаммов, использованных при первом и повторном титрованиях.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». В маркировке лекарственной формы «раствор» должна быть предусмотрена предупредительная надпись «При помутнении не применять».

Транспортирование и **хранение.** В защищенном от света месте, при температуре от 2 до 8 °С в соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С в течение срока, не превышающего 1 мес.

Бактериофаг бактерий стафилококка+ стрептококка + протея+ синегнойной палочки+ клебсиеллы пневмонии+ кишечной палочки поликомпонентный, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения	ФС.3.3.1.0083.18 Взамен ФС 42-3898-99

Настоящая фармакопейная статья распространяется на бактериофаг бактерий стафилококка + стрептококка + протея + синегнойной палочки + клебсиеллы пневмонии + кишечной палочки, поликомпонентный, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения.

Препарат представляет собой стерильный раствор, содержащий комплекс очищенных бактериофагов, обладающих литической активностью не менее 10^{-5} (по Аппельману) в отношении бактерий *Staphylococcus spp, Streptococcus spp, Proteus vulgaris, Proteus mirabilis, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli*.

В состав препарата входят вспомогательные вещества.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство лечебно-профилактического бактериофага и требования, предъявляемые к производственным штаммам, штаммам для контроля и маточным бактериофагам, должны соответствовать требованиям, изложенным в ОФС «Бактериофаги».

Контроль качества производственных штаммов должен проводиться не

реже 1 раза в год.

ИСПЫТАНИЕ

Описание. Прозрачная жидкость желтого цвета различной степени интенсивности, допускается зеленоватый оттенок. Определение проводят визуально.

Подлинность. Препарат должен специфически лизировать бактерии *Staphylococcus spp, Streptococcus spp, P vulgaris, P. mirabilis, P. aeruginosa, K. pneumoniae, E. coli.* Подлинность препарата подтверждается его специфической активностью согласно разделу «Специфическая активность».

pH. От 6,6 до 7,8. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем».

Стерильность. Препарат должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методом прямого посева с использованием тиогликолевой среды и жидкой среды Сабуро.

В условиях испытания препарат не должен обладать антимикробным действием. Указания по его устранению вместе с информацией о методе испытания на стерильность, указывают в нормативной документации.

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Для контроля отбирают по 3 флакона от серии, объединяя их в общую пробу. Тест-дозу в объеме 1 мл вводят подкожно белым мышам массой 19-21 г (используют 5 животных). Срок наблюдения 48 ч. В течение предусмотренного срока наблюдения не должна погибнуть ни одна мышь.

Специфическая активность. Препарат должен лизировать бактерии *Staphylococcus spp, Streptococcus spp, P vulgaris, P. mirabilis, P. aeruginosa, K. pneumoniae, E. coli* в разведении не менее 10^{-5}

Определение активности проводят титрованием по методу Аппельмана на

питательном бульоне для культивирования микроорганизмов – мясо-пептонном бульоне (МПБ) или аналогичном, или бульоне Хоттингера в соответствии с ОФС «Бактериофаги» (раздел «Специфическая активность»).

Для контроля отбирают по 2 образца (флакона) от каждой серии. Для определения активности используют тест-штаммы из коллекции контрольных штаммов предприятия.

Рекомендуемое число тест-штаммов для бактерий рода *Staphylococcus -7; Streptococcus – 7, Proteus- 6, P. aeruginosa – 7* (не менее 4-х), *K. pneumoniae - 8* (не менее 7), *E. coli – 12* (не менее 7).

Если хотя бы на одном штамме активность препарата оказывается меньше установленной, контроль проводят на удвоенном количестве штаммов того же вида бактерий, который дал неудовлетворительный результат. Препарат считают выдержавшим испытания, если лизировались не менее 75% штаммов, использованных при первом и повторном титрованиях.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». В маркировке лекарственной формы «раствор» должна быть предусмотрена предупредительная надпись «При помутнении не применять».

Транспортирование и **хранение.** В сухом, защищенном от света месте, при температуре от 2 до 8 °С в соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С не более 1 мес.

Бактериофаг бактерий стафилококка + энтерококка + стрептококка + синегнойной палочки + клебсиелл + кишечной палочки + протея поликомпонентный, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения	ФС.3.3.1.0084.18 Взамен ФС 42-3236-95

Настоящая фармакопейная статья распространяется на бактериофаг бактерий стафилококка + энтерококка + стрептококка + синегнойной палочки + клебсиелл + кишечной палочки + протея, поликомпонентный, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения.

Препарат бактериофага представляет собой стерильный раствор, содержащий комплекс очищенных бактериофагов, обладающих литической активностью (по Аппельману) не менее10^{-5} в отношении бактерий родов *Staphylococcus spp., Enterococcus spp., Streptococcus spp., Escherichia coli, Proteus vulgaris* и *Proteus mirabilis;* не менее10^{-4} - бактерий родов *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella pneumonia* и *Klebsiella oxytoca*. Препарат не обладает антимикробным действием.

В состав препарата входят вспомогательные вещества.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство лечебно-профилактического бактериофага и требования, предъявляемые к производственным штаммам, штаммам для контроля и маточным бактериофагам, должны соответствовать требованиям, изложенным

в ОФС «Бактериофаги».

Контроль качества производственных штаммов должен проводиться не реже 1 раза в год.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачная жидкость желтого цвета различной степени интенсивности, возможен зеленоватый оттенок. Определение проводят визуально.

Подлинность. Препарат должен специфически лизировать бактерии *Staphylococcus spp., Enterococcus spp., Streptococcus spp., P. aeruginosa, K. pneumoniae, K. oxytoca, E.coli, P.vulgaris, P. mirabilis.* Подлинность препарата подтверждается его специфической активностью согласно разделу «Специфическая активность».

pH. От 6,6 до 7,8. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем».

Стерильность. Препарат должен быть стерильным (не должен быть контаминирован посторонними микроорганизмами). Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методом прямого посева или мембранной фильтрации.

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Для контроля отбирают по 3 флакона от серии, объединяя их в общую пробу. Тест-дозу в объеме 1 мл вводят подкожно 5-ти белым мышам массой 19-21 г. Срок наблюдения 48 ч. В течение предусмотренного срока наблюдения не должна погибнуть ни одна мышь.

Специфическая активность. Препарат должен лизировать бактерии в разведении не менее:

– 10^{-5} - *Staphylococcus spp., Enterococcus spp., Streptococcus spp., E. coli,*

P.vulgaris, P.vulgaris;

– 10^{-4} – *P. aeruginosa, K. pneumoniae, K.oxytoca*.

Определение активности проводят титрованием по методу Аппельмана на питательном бульоне для культивирования микроорганизмов – мясо-пептонном бульоне (МПБ) или аналогичном, или бульоне Хоттингера, или мясо-гидролизном бульоне в соответствии с ОФС «Бактериофаги» (раздел «Специфическая активность»).

Для контроля отбирают по 2 образца (флакона) от каждой серии. Для определения активности используют тест-штаммы из коллекции контрольных штаммов предприятия: не менее 7 штаммов бактерий *Staphylococcus spp, Enterococcus spp, Streptococcus spp, P.vulgaris, P.vulgaris, P.aeruginosa, K. pneumoniae, K.oxytoca* и 12 штаммов *E.coli* различных серогрупп.

Результат учитывают через 4 ч инкубации для *E.coli, P.vulgaris, P.vulgaris, K. pneumoniae, K.oxytoca,*через 10 ч – для *Enterococcus spp,* через 18-22 ч – для *Staphylococcus spp, Streptococcus spp, P. aeruginosa.*

Если хотя бы на одном штамме активность препарата оказывается меньше установленной, контроль проводят на удвоенном количестве штаммов того же вида бактерий, который дал неудовлетворительный результат. Препарат считают выдержавшим испытания, если лизировались не менее 75% штаммов, использованных при первом и повторном титрованиях.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». В маркировке лекарственной формы «раствор» должна быть предусмотрена предупредительная надпись «При помутнении не применять».

Транспортирование и **хранение.** В сухом, защищенном от света месте, при температуре от 2 до 8 ^{o}C в соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 ^{o}C не более1 мес.

Бактериофаг бактерий шигелл + сальмонелл + кишечной палочки + протея + энтерококка + стафилококка + синегнойной палочки поликомпонентный, раствор для приема внутрь и ректального введения	ФС.3.3.1.0085.18 Взамен ФС 42-3200-95

Настоящая фармакопейная статья распространяется на бактериофаг бактерий шигелл + сальмонелл + кишечной палочки + протея + энтерококка + стафилококка + синегнойной палочки поликомпонентный, раствор для приема внутрь и ректального введения. Препарат представляет собой стерильный раствор, содержащий комплекс очищенных бактериофагов, обладающих литической активностью (по Аппельману) не менее:

10^{-6} в отношении бактерий родов *Shigella flexneri* 1, 2, 3, 4 серотипов;

10^{-5} – *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium;*

10^{-4} – *Shigella flexneri* 6 серотипа, *Salmonella paratyphi A, S. paratyphi B, S. infantis, S. choleraesuis, S. oranienburg, S. enteritidis, Escherichia coli, Proteus, vulgaris, Proteus mirabilis, Enterococcus, Staphylococcus, Pseudomonas aeruginosa.*

В состав препарата входят вспомогательные вещества.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство лечебно-профилактического бактериофага и требования, предъявляемые к производственным штаммам, штаммам для контроля и маточным бактериофагам, должны соответствовать требованиям,

изложенным в ОФС «Бактериофаги».

Контроль качества производственных штаммов должен проводиться не реже 1 раза в год.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачная жидкость желтого цвета различной степени интенсивности, допускается зеленоватый оттенок. Определение проводят визуально.

Подлинность. Препарат должен специфически лизировать бактерии *S. flexneri* 1, 2, 3, 4, 6 серотипов, *S. sonnei, S. typhimurium, S paratyphi A, S. paratyphi B, S. infantis, S. choleraesuis, S. oranienburg, S. enteritidis, E coli*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *Enterococcus spp*, *Staphylococcus spp, P. aeruginosa.* Подлинность препарата подтверждается его специфической активностью согласно разделу «Специфическая активность».

pH. От 6,6 до 7,8. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем».

Стерильность. Препарат должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методом прямого посева или мембранной фильтрации с использованием тиогликолевой среды и жидкой среды Сабуро.

В условиях испытания препарат не должен обладать антимикробным действием. Указания по его устранению вместе с информацией о методе испытания на стерильность, указывают в нормативной документации.

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичным в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Для контроля отбирают по 3 флакона от серии, объединяя их в общую пробу. Тест-

дозу в объеме 1 мл вводят подкожно белым мышам массой 19-21 г (используют 5 животных). Срок наблюдения 48 ч. В течение предусмотренного срока наблюдения не должна погибнуть ни одна мышь.

Специфическая активность. Препарат должен лизировать бактерии в разведении не менее:

10^{-6} – *S. flexneri* 1, 2, 3, 4 серотипов;

10^{-5} – *S. sonnei, S. typhimurium;*

10^{-4} – *S. flexneri* 6 серотипа, *S paratyphi A, S. paratyphi B, S. infantis, S. choleraesuis, S. oranienburg, S. enteritidis, E. coli, P. vulgaris, P. mirabilis, Enterococcu spp s, Staphylococcus spp, P. aeruginosa.*

Определение активности проводят титрованием по методу Аппельмана на питательном бульоне для культивирования микроорганизмов – мясо-пептонном бульоне (МПБ) или аналогичном, или бульоне Хоттингера, или мясо-гидролизном бульоне в соответствии с ОФС «Бактериофаги» (раздел «Специфическая активность»).

Для контроля отбирают по 2 образца (флакона) от каждой серии. Для определения активности используют 6 штаммов *E. coli* различных серотипов и по 2 тест-штамма всех остальных вышеперечисленных микроорганизмов из коллекции контрольных штаммов предприятия.

Если хотя бы на одном штамме активность препарата оказывается меньше установленной, контроль проводят на удвоенном количестве штаммов того же вида бактерий, который дал неудовлетворительный результат. Препарат считают выдержавшим испытания, если лизировались не менее 75% штаммов, использованных при первом и повторном титрованиях.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». В маркировке лекарственной формы «раствор» должна быть предусмотрена предупредительная надпись «При помутне-

нии не применять».

Транспортирование и **хранение.** В сухом, защищенном от света месте, при температуре от 2 до 8 °С в соответствии с ОФС «Лекарственные формы» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С не более1 мес.

Плазма человека	ФС.3.3.2.0001.18
для фракционирования	Взамен ФС.3.3.2.0001.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на плазму для фракционирования, представляющую собой жидкую часть крови человека, остающуюся после отделения клеточных элементов крови, заготовленной с антикоагулянтом. Плазму для фракционирования получают из цельной крови человека методами центрифугирования, афереза и др. Плазма человека для фракционирования не должна содержать антибактериальных и противогрибковых средств.

Плазма человека для фракционирования используется в качестве субстанции для производства препаратов крови человека.

Доноры. Для производства плазмы крови человека может быть использована плазма здоровых доноров, отобранных по результатам медицинского обследования, изучения медицинского анамнеза и лабораторного исследования крови в соответствии с требованиями действующих нормативных правовых актов.

Зарегистрированные данные должны обеспечить идентификацию и прослеживаемость донора, каждой единицы плазмы, включённой в пул, а также связанных с ними образцов для лабораторных исследований.

Индивидуальная единица плазмы. Индивидуальная единица плазмы подвергается обязательному тестированию на отсутствие поверхностного антигена вируса гепатита В, на антитела к вирусу гепатита С, антигену р24ВИЧ-1, антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, антитела к возбудителю сифилиса.

Образцы плазмы с отрицательными результатами тестов объединяют в минипулы и подвергают исследованию на наличие нуклеиновых кислот вирусов иммунодефицита человека, вирусов гепатитов В и С. При положительных результатах тестов плазму таких доноров бракуют и уничтожают.

Заготовка плазмы. Плазма, предназначенная для выделения лабильных белков (факторов свёртывания крови), должна быть заморожена до температуры минус 25°С и ниже не позднее 24 ч после донации.

Плазма, предназначенная для выделения стабильных белков (альбумин, иммуноглобулины), полученная аферезом, должна быть заморожена до температуры минус 20 °С и ниже не позднее 24 ч после донации, а полученная иными способами до температуры минус 20 °С и ниже не позднее 72 ч после донации.

Для заготовки крови и ее компонентов используют полимерные контейнеры одноразового применения, соответствующие установленным требованиям. Упаковка должна быть герметичной для исключения контаминации микроорганизмами.

Карантинизация. Индивидуальные единицы плазмы подвергаются карантинизации в соответствии с действующими нормативными правовыми актами. При выявлении у донора гемотрансмиссивных инфекций в период карантинизации или наличии в крови донора по истечении срока карантинизации специфических и неспецифических маркеров гемотрансмиссивных инфекций, замороженная плазма, заготовленная от донора, должна быть изолирована, подвергнута дезинфекции и утилизирована с обязательной регистрацией этой процедуры.

Перед формированием производственного пула (загрузки) индивидуальные единицы плазмы объединяют для проведения испытаний по показателям. Количество объединяемых индивидуальных единиц указывают в нормативной документации. При производстве препаратов крови производственный пул (загрузку) плазмы обязательно тестируют на антиген

р24 ВИЧ-1 и антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, на антитела к вирусу гепатита С, поверхностный антиген вируса гепатита В, возбудитель сифилиса иммунологическими методами и на наличие нуклеиновых кислот вирусов иммунодефицита человека, вирусов гепатитов В и С.

Результаты тестирования производственного пула по вирусной безопасности плазмы должны быть отрицательными.

Количество объединяемых индивидуальных единиц плазмы указывают в нормативной документации.

ИСПЫТАНИЕ

Описание. В замороженном состоянии – плотная затвердевшая масса желтоватого цвета. До замораживания и после размораживания (оттаивания) – прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость от светло-жёлтого до зеленоватого цвета. Не допускается наличие мути и хлопьев.

Примечание

Оттаивание индивидуальных единиц плазмы проводят при температуре (35-37)°С в течение 15 мин.

Подлинность (видоспецифичность). Подтверждается наличием прослеживаемости доноров, гарантирующих человеческую природу плазмы человека для фракционирования.

Гемпигменты. Оптическая плотность испытуемого раствора должна быть не более 0,25. Определение проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» в кюветах с толщиной слоя 10 мм при длине волны 403 нм относительно воды.

Примечание

Подготовка испытуемого образца. Испытуемый образец плазмы для фракционирования разводят 0,9 % раствором натрия хлорида в соотношении 1:4.

pH. От 6,5 до 7,5. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия», используя размороженную плазму.

Стерильность. Плазма должна быть стерильной. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Стерильность». Метод определения указывают в нормативной документации.

Содержание белка. Не менее 50 г/л. Определение проводят подходящим методом в соответствии с ОФС «Определение белка».

Специфическая активность. В плазме человека для фракционирования, используемой для производства препаратов иммуноглобулина человека нормального, указывают количественное содержание антибактериальных антител (минимум против одного возбудителя) и противовирусных антител (минимум против одного возбудителя).

В плазме человека для фракционирования, используемой для производства препаратов иммуноглобулинов человека специфического и специального назначения, указывают количественное содержание специфических антител. Определение проводят по методике(ам), указанной (ым) в нормативной документации с использованием стандартных образцов.

В плазме для фракционирования, используемой для производства препаратов лабильных белков (факторы свёртывания крови), проводят определение активности фактора VIII в соответствии с ОФС «Определение активности факторов свертывания крови». Активность фактора VIII должна быть не менее 0,7 МЕ/мл. Испытание проводят в объединенной пробе, содержащей не менее 10 индивидуальных единиц плазмы.

Вирусная безопасность

Поверхностный антиген (HBsAg) и нуклеиновая кислота вируса гепатита В. Должны отсутствовать. Определение проводят иммунологическими методами и методами амплификации нуклеиновых кислот соответствующей чувствительности с тест-системами и наборами реактивов, разрешенными к применению, в соответствии с прилагаемыми к ним инструкциями.

Антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1, ВИЧ-2) и нуклеиновая кислота вируса иммунодефицита человека. Должны отсутствовать. Определение проводят иммунологическими методами и методами амплификации нуклеиновых кислот соответствующей чувствительности с тест-системами и наборами реактивов, разрешенными к применению, в соответствии с прилагаемыми к ним инструкциями.

Антитела к вирусу гепатита С и нуклеиновая кислота вируса гепатита С. Должны отсутствовать. Определение проводят иммунологическими методами и методами амплификации нуклеиновых кислот соответствующей чувствительности с тест-системами и наборами реактивов, разрешенными к применению, в соответствии с прилагаемыми к ним инструкциями.

Антитела к возбудителю сифилиса. Плазма не должна содержать антител к возбудителю сифилиса. Определение проводят иммунологическими методами соответствующей чувствительности с коммерческими диагностическими наборами и тест-системами, разрешенными к применению в РФ, в соответствии с прилагаемыми к ним инструкциями.

Упаковка и маркировка. Первичная упаковка (полимерные контейнеры одноразового применения) должна быть герметичной, обеспечивать сохранение заявленных свойств плазмы в течение регламентированного срока годности и разрешена к применению для упаковки лекарственных средств.

На этикетке упаковки указывают наименование и адрес организации донорства крови и ее компонентов, идентификационный номер и дату донации, дату производства единицы плазмы (в случае, когда не совпадает с датой донации), дату окончания срока хранения, наименование антикоагулянта и (или) добавочного раствора, наименование компонента крови, объем или массу плазмы крови либо компонентов крови, условия хранения (с указанием температуры хранения плазмы для производства препаратов лабильных или стабильных белков), указание на дополнительную

обработку (облучение, фильтрацию, инактивацию), надпись «Антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, к вирусу гепатита С и поверхностный антиген вируса гепатита В отсутствуют». Дополнительно возможно указание группы крови АВО, резус-фактор и индивидуальный код донора.

Транспортировка и хранение. Плазма для фракционирования, используемая для производства препаратов стабильных белков (альбумин, иммуноглобулины) при температуре минус 25 °С и ниже. специальных рефрижераторах (камерах, модулях), оборудованных датчиками и регистрирующими температуру устройствами».

Плазма для фракционирования, используемая для производства препаратов лабильных белков (факторы свёртывания крови) при температуре минус 30 °С и ниже.

Фактор свертывания крови VII человека	ФС.3.3.2.0002.18 Взамен ФС.3.3.2.0002.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на препараты фактора свертывания крови VII человека, полученные из плазмы крови человека для фракционирования.

Фактор свертывания крови VII человека представляет собой белковую фракцию плазмы крови человека, содержащую одноцепочечный гликопротеиновый фактор свертывания крови VII и небольшие количества активированной формы двухцепочечного производного фактора VIIa.

Препараты фактора свертывания крови VII человека могут содержать факторы свертывания II, IX, X, протеин C и протеин S, содержание которых определяют в готовом препарате. Препараты фактора свертывания крови VII человека не содержат консерванты и антибиотики.

ПРОИЗВОДСТВО

Для производства препаратов фактора свертывания крови VII человека используют плазму крови здоровых доноров, соответствующую требованиям ФС «Плазма человека для фракционирования».

Технология производства включает стадии удаления или инактивации инфекционных агентов. Если для инактивации вирусов в производстве используют химические соединения, их концентрация должна быть снижена до уровня, не влияющего на безопасность препарата для пациентов. В процессе производства не используют антимикробные консерванты. Метод производства должен обеспечивать отсутствие возможности активации тромбинообразующих факторов свертывания крови.

Препарат может содержать стабилизаторы (альбумин, полисорбат, натрия хлорид, натрия цитрат, кальция хлорид, глицин, лизин, гепарин, антитромбин и др.). Активность фактора VII должна составлять не менее 2 МЕ на мг белка до внесения стабилизаторов белковой природы. Раствор препарата методом стерилизующей фильтрации асептически расфасовывают в первичную упаковку, лиофилизируют и укупоривают под вакуумом или в атмосфере инертного газа.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Препарат представляет собой аморфную гигроскопичную массу в виде таблетки или порошка белого или бледно-желтого цвета (если в нормативной документации нет других указаний). Определение проводят визуально.

Подлинность

Видоспецифичность. Подтверждают наличием только сывороточных белков крови человека. Испытание проводят методом иммуноэлектрофореза в геле с использованием сывороток против сывороточных белков крови человека, крупного рогатого скота, лошади и свиньи в соответствии с ОФС «Иммуноэлектрофорез в агаровом геле». Допустимо проведение испытания методом иммунодиффузии в геле в соответствии с ОФС «Иммунодиффузия в геле». В результате испытания должны выявляться линии преципитации только с сывороткой против сывороточных белков крови человека.

Фактор VII. Подтверждают наличием активности фактора VII. Испытание проводят хромогенным или коагулометрическим методом. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение активности факторов свертывания крови».

Время получения восстановленного препарата. Не более 10 мин (если в нормативной документации нет других указаний). Приводят описание методики с указанием применяемого растворителя, его объема и условий растворения (температура растворителя, необходимость перемешивания и др.).

Вода. Не более 2%. Определение проводят методом К.Фишера в соответствии с ОФС «Определение воды» (если в нормативной документации нет других указаний). Метод определения и необходимое для испытаний количество образца указывают в нормативной документации.

Механические включения. Видимые механические включения должны отсутствовать. Определение проводят в соответствии с ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах». В нормативной документации указывают название растворителя, описывают методику восстановления и (при необходимости) подготовки препарата.

pH. от 6,5 до 7,5. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Осмоляльность. Не менее 240 мОсм/кг. Определение проводят в соответствии с ОФС «Осмолярность».

Белок. Количественное содержание белка в расчете на флакон или мл восстановленного раствора указывают в нормативной документации. Определение проводят подходящим методом в соответствии с ОФС «Определение белка».

Гепарин (для препаратов, содержащих гепарин). Не более 0,5 МЕ на 1 МЕ фактора свертывания крови VII. Определение проводят хромогенным методом в соответствии с ОФС «Определение активности факторов свертывания крови».

Тромбин. Должен отсутствовать. Определение проводят коагулометрическим методом в соответствии с ОФС «Определение активности факторов свертывания крови» (тест на отсутствие тромбина).

Активированные факторы свертывания крови. Для каждого из разведений(1:10, 1:100) время свертывания должно составлять не менее 150 С. Определение проводят коагулометрическим методом в соответствии с ОФС «Определение активности факторов свертывания крови».

Активность фактора свертывания крови VII человека. Не менее 15 МЕ на мл восстановленного препарата. Определение проводят хромогенным методом или коагулометрическим методом в соответствии с ОФС «Определение активности факторов свертывания крови».

Специфическая активность Должна составлять не менее 2 МЕ на мг белка (при отсутствии стабилизаторов белковой природы).

Специфическую активность препарата рассчитывают по формуле:

$$\text{специфическая активность} = \frac{\text{активность фактора свертывания крови VII}}{\text{содержание белка}}$$

Активность фактора свертывания крови II. Активность фактора свертывания крови II в расчете на флакон или мл восстановленного раствора указывают в нормативной документации. Определение проводят хромогенным или коагулометрическим методом в соответствии с ОФС «Определение активности факторов свертывания крови».

Активность фактора свертывания крови IX. Активность фактора свертывания крови IX в расчете на флакон или мл восстановленного раствора указывают в нормативной документации. Определение проводят коагулометрическим методом в соответствии с ОФС «Определение активности факторов свертывания крови».

Примечание

Для испытаний готовят восстановленный раствор препарата (методику восстановления указывают в нормативной документации производителя). При наличии в препарате гепарина его нейтрализуют добавлением протамина сульфата из расчета 10 мкг протамина сульфата на 1 МЕ гепарина.

Активность фактора свертывания крови X. Активность фактора свертывания крови X в расчете на флакон или мл восстановленного раствора указывают в нормативной документации. Определение проводят хромогенным или коагулометрическим методом в соответствии с ОФС «Определение активности факторов свертывания крови».

Стабилизатор(ы). Проводят количественное определение вносимого(ых) в препарат стабилизатора(ов) в соответствии с ОФС «Газовая хрома-

тография» и/или ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», если в нормативной документации нет других указаний.

Допустимый предел содержания стабилизатора(ов) должен быть указан в нормативной документации.

Вирусинактивирующие агенты. Проводят количественное определение остаточного содержания в препарате вирусинактивирующего(их) агента(ов) в соответствии с ОФС «Газовая хроматография» и/или ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», если в нормативной документации нет других указаний. Допустимый предел содержания вирусинактивирующего(их) агента(ов) должен быть указан в нормативной документации.

Стерильность. Препарат должен быть стерильным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность или актериальные эндотоксины. Должен быть апирогенным или содержать бактериальные эндотоксины в количестве не более 0,1 ЕЭ на 1 МЕ фактора свертывания крови VII.

Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность» (не менее 30 МЕ фактора свертывания крови VII на 1 кг массы животного; объем вводимого препарата не должен превышать 10 мл на 1 кг массы животного) или с ОФС «Бактериальные эндотоксины» методом, указанным в нормативной документации.

Вирусная безопасность

Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg). Препарат не должен содержать поверхностного антигена вируса гепатита В. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих чувствительность не ниже 0,1 МЕ/мл в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу гепатита С. Антитела к вирусу гепатита С должны отсутствовать. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здраво-

охранения России и имеющих 100 % чувствительность и специфичность в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Препарат не должен содержать антител к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих 100% чувствительность и специфичность в соответствии с инструкциями по применению.

Упаковка и маркировка. В соответствии ОФС «Лекарственные препараты из плазмы крови человека».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С в соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств» и ОФС «Хранение лекарственных средств». Замораживание не допускается.

Фактор свертывания крови VIII человека	ФС.3.3.2.0003.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на препараты фактора свертывания крови VIII человека, полученные из плазмы крови человека для фракционирования.

Фактор свертывания крови VIII человека является препаратом белковой фракции крови человека, содержащим гликопротеиновый комплекс фактора свертывания крови VIII и, в зависимости от метода получения, различные количества фактора Виллебранда.

Активность препарата после восстановления в условиях, указанных на этикетке, должна быть не менее 20 МЕ фактора VIII в 1 мл.

ПРОИЗВОДСТВО

Для производства препаратов фактора свертывания крови VIII человека используется плазма крови здоровых доноров, соответствующая требованиям ФС «Плазма человека для фракционирования». Технология производства включает стадии удаления или инактивации инфекционных агентов. Если для инактивации вирусов в производстве используют химические соединения, их концентрация должна быть снижена до уровня, не влияющего на безопасность препарата для пациентов. В процессе производства не используются антимикробные консерванты. Препарат может содержать стабилизаторы (альбумин, полисорбат, натрия хлорид, натрия цитрат, кальция хлорид, глицин, лизин и др.). Раствор препарата методом стерилизующей фильтрации асептически расфасовывают в первичную упаковку, лиофилизируют и укупоривают под вакуумом или в атмосфере инертного газа.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Белый или бледно-желтый порошок или рыхлое твердое вещество. Определение проводят визуально.

Подлинность

Видоспецифичность. Подтверждают наличием только сывороточных белков крови человека. Испытание проводят методом иммуноэлектрофореза в геле с использованием сывороток против сывороточных белков крови человека, крупного рогатого скота, лошади и свиньи в соответствии с ОФС «Иммуноэлектрофорез в агаровом геле». Допустимо проведение испытания методом иммунодиффузии в геле в соответствии с ОФС «Иммунодиффузия в геле». В результате испытания должны выявляться линии преципитации только с сывороткой против сывороточных белков крови человека.

Фактор VIII. Подтверждают наличием активности фактора VIII. Испытание проводят хромогенным или коагулометрическим методом. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение активности факторов свертывания крови».

Время получения восстановленного препарата. Не более 10 мин (если в нормативной документации нет других указаний). Приводят описание методики с указанием применяемого растворителя, его объема и условий растворения (температура растворителя, необходимость перемешивания и др.).

Вода. Не более 2 %. Определение проводят методом К.Фишера в соответствии с ОФС «Определение воды» (если в нормативной документации нет других указаний). Метод определения и необходимое для испытаний количество образца указывают в нормативной документации.

Механические включения. Видимые механические включения должны отсутствовать. Определение проводят в соответствии с ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах». В нормативной документации указывают название растворителя, описывают методику восстановления и

(при необходимости) подготовки препарата.

pH. От 6,5 до 7,5. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Осмоляльность. Не менее 240 мОсм/кг. Определение проводят в соответствии с ОФС «Осмолярность».

Белок. Количественное содержание белка в расчете на флакон или мл восстановленного раствора указывают в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение белка».

Активность фактора свертывания крови VIII. Активность фактора свертывания крови VIII в расчете на флакон или мл восстановленного раствора указывают в нормативной документации. Определение проводят коагулометрическим методом в соответствии с ОФС «Определение активности факторов свертывания крови».

Фактор Виллебранда. Активность фактора свертывания Виллебранда в расчете на флакон или мл восстановленного раствора указывают в нормативной документации. Определение проводят методом агглютинации или иммуноферментным методом в соответствии с ОФС «Определение активности факторов свертывания крови».

Анти-А и анти-В гемагглютинины. Агглютинация должна отсутствовать в разведении препарата 1:64. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение анти-А и анти-В гемагглютининов в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека».

Стабилизатор(ы). Проводят количественное определение вносимого(ых) в препарат стабилизатора(ов) в соответствии с ОФС «Газовая хроматография» и/или ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», если в нормативной документации нет других указаний.

Допустимый предел содержания стабилизатора(ов) должен быть указан в нормативной документации.

Вирусинактивирующие агенты. Проводят количественное определение остаточного содержания в препарате вирусинактивирующего(их) аген-

та(ов) в соответствии с ОФС «Газовая хроматография» и/или ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», если в нормативной документации нет других указаний. Допустимый предел содержания вирусинактивирующего(их) агента(ов) должен быть указан в нормативной документации.

Стерильность. Препарат должен быть стерильным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность или бактериальные эндотоксины. Должен быть апирогенным или содержать бактериальные эндотоксины в количестве не более 0,03 ЕЭ на 1 МЕ активности фактора свертывания крови VIII.

Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность» (тест-доза– не менее 50 МЕ фактора свертывания крови VIII на 1 кг массы животного) или в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины» методом, указанным в нормативной документации.

Вирусная безопасность

Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg). Препарат не должен содержать поверхностного антигена вируса гепатита В. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих чувствительность не ниже 0,1 МЕ/мл в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу гепатита С. Антитела к вирусу гепатита С должны отсутствовать. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих 100% чувствительность и специфичность в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Препарат не должен содержать антител к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих

100% чувствительность и специфичность в соответствии с инструкциями по применению.

Упаковка и маркировка. В соответствии ОФС «Лекарственные препараты из плазмы крови человека».

Х**ранение.** В защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С.

Фактор свертывания крови IX человека	ФС.3.3.2.0004.18 Взамен ФС.3.3.2.0004.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на препараты фактора свертывания крови IX человека, полученные из плазмы крови человека для фракционирования.

Фактор свертывания крови IX человека является препаратом белковой фракции крови человека, полученным из плазмы для фракционирования методом, эффективно отделяющим фактор IX от других факторов протромбинового комплекса (II, VII, X).

Активность препарата после восстановления в условиях, указанных на этикетке, должна быть не менее 20 МЕ фактора IX в 1 мл.

ПРОИЗВОДСТВО

Для производства препаратов фактора свертывания крови IX человека используется плазма крови здоровых доноров, соответствующая требованиям ФС «Плазма человека для фракционирования».

Технология производства включает стадии удаления или инактивации инфекционных агентов. Если для инактивации вирусов в производстве используют химические соединения, их концентрация должна быть снижена до уровня, не влияющего на безопасность препарата для пациентов.

Препарат может содержать стабилизаторы (альбумин, антитромбин III, полисорбат-80, натрия хлорид, натрия цитрат, глицин и др.). Специфическую активность (не менее 50 МЕ/мг общего белка) определяют до добавления любого белка-стабилизатора.

В процессе производства не используются антимикробные консерванты. Раствор препарата методом стерилизующей фильтрации асептически расфасовывают в первичную упаковку, лиофилизируют и укупоривают под вакуумом или в атмосфере инертного газа.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Белый или бледно-желтый порошок или рыхлое твердое вещество (если в нормативной документации нет других указаний). Определение проводят визуально.

Подлинность.

Фактор IX. Подтверждают наличием активности фактора IX. Определение проводят коагулометрическим или хромогенным методом в соответствии с ОФС «Определение активности факторов свертывания крови».

Время получения восстановленного препарата. Не более 10 мин (если в нормативной документации нет других указаний). Приводят описание методики с указанием применяемого растворителя, его объема и условий растворения (температура растворителя, необходимость перемешивания и др.).

Вода. Не более 2 %. Определение проводят методом К. Фишера в соответствии с ОФС «Определение воды» (если в нормативной документации нет других указаний). Метод определения и необходимое для испытаний количество образца указывают в нормативной документации.

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах». В нормативной документации указывают название растворителя, описывают методику восстановления и (при необходимости) подготовки препарата.

pH. От 6,5 до 7,5. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Осмоляльность. Не менее 240 мОсм/кг. Определение проводят в соответствии с ОФС «Осмолярность».

Белок. Количественное содержание белка в расчете на флакон или мл восстановленного раствора указывают в нормативной документации. Опре-

деление проводят подходящим методом в соответствии с ОФС «Определение белка».

Активность фактора свертывания крови IX. Активность фактора свертывания крови IX в расчете на флакон или мл восстановленного раствора указывают в нормативной документации. Определение проводят хромогенным или коагулометрическим методом в соответствии с ОФС «Определение активности факторов свертывания крови».

Активированные факторы свертывания. Время свертывания разведений препарата 1:10 и 1:100 должно составлять не менее 150 с. Определение проводят коагулометрическим методом в соответствии с ОФС «Определение активности факторов свертывания крови».

Стабилизатор(ы). Проводят количественное определение вносимого(ых) в препарат стабилизатора(ов) в соответствии с ОФС «Газовая хроматография» и/или ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», если в нормативной документации нет других указаний.

Допустимый предел содержания стабилизатора(ов) должен быть указан в нормативной документации.

Вирусинактивирующие агенты. Проводят количественное определение остаточного содержания в препарате вирусинактивирующего(их) агента(ов) в соответствии с ОФС «Газовая хроматография» и/или ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», если в нормативной документации нет других указаний. Допустимый предел содержания вирусинактивирующего(их) агента(ов) должен быть указан в нормативной документации.

Стерильность. Препарат должен быть стерильным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность или бактериальные эндотоксины. Должен быть апирогенным или содержать бактериальные эндотоксины в количестве не более 0,03 ЕЭ на 1 МЕ фактора свертывания крови IX.

Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность» (не менее 50 МЕ фактора свертывания крови IX на 1 кг массы животного) или в соот-

ветствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины» методом, указанным в нормативной документации.

Вирусная безопасность

Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg). Препарат не должен содержать поверхностного антигена вируса гепатита В. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих чувствительность не ниже 0,1 МЕ/мл в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу гепатита С. Антитела к вирусу гепатита С должны отсутствовать. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих 100 % чувствительность и специфичность в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Препарат не должен содержать антител к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих 100 % чувствительность и специфичность в соответствии с инструкциями по применению.

Упаковка и маркировка. В соответствии ОФС « Лекарственные препараты из плазмы крови человека».

Хранение. В защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С.

Фактор Виллебранда ФС.3.3.2.0005.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на препараты фактора Виллебранда, представляющие собой белковую фракцию плазмы крови человека, содержащую гликопротеиновый фактор Виллебранда с различным количеством фактора свертывания крови VIII человека. Препараты фактора Виллебранда не содержат консерванты и антибиотики.

ПРОИЗВОДСТВО

Для производства препаратов фактора Виллебранда используют плазму крови здоровых доноров, соответствующую требованиям ФС «Плазма человека для фракционирования».

Технология производства включает стадии удаления или инактивации инфекционных агентов. Если для инактивации вирусов в производстве используют химические соединения, их концентрация должна быть снижена до уровня, не влияющего на безопасность препарата для пациентов. Метод производства должен обеспечивать получение препарата с постоянным составом в отношении фактора Виллебранда, фактора свертывания крови VIII и их соотношения. Производство должно обеспечивать получение препарата с охарактеризованным распределением различных полимеров фактора Виллебранда и постоянным соотношением активности фактора Виллебранда к содержанию антигена фактора Виллебранда. В процессе производства не используют антимикробные консерванты.

Активность фактора Виллебранда в препарате должна составлять не

менее 1 МЕ на 1мг белка до внесения стабилизаторов белковой природы.

Раствор препарата методом стерилизующей фильтрации асептически расфасовывают в первичную упаковку, лиофилизируют и укупоривают под вакуумом или в атмосфере инертного газа.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Препарат представляет собой аморфную гигроскопичную массу в виде таблетки или порошка белого или бледно-желтого цвета (если в нормативной документации нет других указаний). Определение проводят визуально.

Подлинность

Видоспецифичность. Подтверждают наличием только сывороточных белков крови человека. Испытание проводят методом иммуноэлектрофореза в геле с использованием сывороток против сывороточных белков крови человека, крупного рогатого скота, лошади и свиньи в соответствии с ОФС «Иммуноэлектрофорез в агаровом геле». Допустимо проведение испытания методом иммунодиффузии в геле в соответствии с ОФС «Иммунодиффузия в геле». В результате испытания должны выявляться линии преципитации только с сывороткой против сывороточных белков крови человека.

Фактор Виллебранда. Подтверждают наличием активности фактора Виллебранда. Испытание проводят методом агглютинации или иммуноферментным методом в соответствии с ОФС «Определение активности факторов свертывания крови».

Примечание

При внесении в препарат таких стабилизаторов, как альбумин, определяют их подлинность.

Время получения восстановленного препарата. Не более 10 мин (если в нормативной документации нет других указаний). Приводят описание методики с указанием применяемого растворителя, его объема и условий растворения (температура растворителя, необходимость перемешивания и др.).

Вода. Не более 2%. Определение проводят методом К.Фишера в соответствии с ОФС «Определение воды» (если в нормативной документации нет других указаний). Метод определения и необходимое для испытаний количество образца указывают в нормативной документации.

Механические включения. В восстановленном растворе видимые механические включения должны отсутствовать. Определение проводят в соответствии с ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах». Указывают название растворителя, описывают методику восстановления препарата и необходимость его фильтрации через прилагаемый фильтр.

pH. От 6,5 до 7,5. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Осмоляльность. Не менее 240 мОсм/кг. Определение проводят в соответствии с ОФС «Осмолярность».

Белок. Количественное содержание белка в расчете на 1 флакон или 1 мл восстановленного раствора указывают в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение белка».

Анти-А и анти-В гемагглютинины. Агглютинация должна отсутствовать в разведении препарата 1:64. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение анти-А и анти-В гемагглютининов в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека».

Примечание

Подготовка испытуемого образца. Восстановленный препарат разводят 0,9 % раствором натрия хлорида или буферным раствором низкой ионной силы (LISS) до содержания фактора Виллебранда 6 МЕ/мл.

Активность фактора Виллебранда. Не менее 20 МЕ на 1мл восстановленного препарата. Определение проводят методом агглютинации или иммуноферментным методом в соответствии с ОФС «Определение активности факторов свертывания крови».

Активность фактора свертывания крови VIII человека. Активность фактора свертывания крови VIII в расчете на 1 флакон или 1 мл восстанов-

ленного раствора указывают в нормативной документации. Определение активности фактора VIII проводят в тех случаях, когда его содержание в препарате более 10 МЕ фактора VIII в 100 МЕ активности фактора Виллебранда.

Определение проводят хромогенным или коагулометрическим методом в соответствии с ОФС «Определение активности факторов свертывания крови».

Стабилизатор(ы). Проводят количественное определение вносимого(ых) в препарат стабилизатора(ов) методом(ами) в соответствии с ОФС «Газовая хроматография» и/или ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», если в нормативной документации нет других указаний. Допустимый предел содержания стабилизатора(ов) должен быть указан в нормативной документации.

Вирусинактивирующие агенты. Проводят количественное определение остаточного содержания в препарате вирусинактивирующего(их) агента(ов) в соответствии с ОФС «Газовая хроматография» и/или ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», если в нормативной документации нет других указаний. Допустимый предел содержания вирусинактивирующего(их) агента(ов) должен быть указан в нормативной документации.

Стерильность. Препарат должен быть стерильным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность или бактериальные эндотоксины. Должен быть апирогенным или содержать бактериальные эндотоксины в количестве не более 0,05 МЕ эндотоксинов в 1 МЕ активности фактора Виллебранда.

Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность» (не менее 100 МЕ фактора Виллебранда на 1 кг массы животного; объем вводимого препарата не должен превышать 1 мл на 1 кг массы животного) или испытания проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины» методом, указанным в нормативной документации.

Вирусная безопасность

Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg). Препарат не

должен содержать поверхностного антигена вируса гепатита В. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих чувствительность не ниже 0,1 МЕ/мл в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу гепатита С. Антитела к вирусу гепатита С должны отсутствовать. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих 100% чувствительность и специфичность в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Препарат не должен содержать антител к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих 100% чувствительность и специфичность в соответствии с инструкциями по применению.

Упаковка и маркировка. В соответствии ОФС «Лекарственные препараты из плазмы крови человека».

Х**ранение.** Хранят в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С.

Альбумин человека	ФС.3.3.2.0006.18 Взамен ФС.3.3.2.0006.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на препараты альбумина человека, растворы для инфузий 5, 10, 20 и 25 %, содержащие основной белок донорской плазмы человека.

ПРОИЗВОДСТВО

Для производства препаратов альбумина используется плазма крови здоровых доноров, соответствующая требованиям ФС «Плазма человека для фракционирования».

Препараты альбумина человека, растворы для инфузий получают модифицированным спиртовым методом фракционирования белков из сыворотки крови человека при низких температурах. Производство альбумина должно гарантировать сохранение структуры и функции белка альбумина, обеспечивающее специфическую и вирусную безопасность препарата, исключающее контаминацию чужеродными агентами.

Раствор альбумина человека прогревают при температуре 60 ^{o}C не менее 10 ч, а затем выдерживают при температуре (30 – 32) ^{o}C в течение 14 сут или при температуре (20 - 25) ^{o}C не менее 4 нед, после чего исследуют визуально для обнаружения признаков микробного загрязнения.

Альбумин содержит стабилизаторы: натрия каприлат, N-ацетилтриптофан или их сочетание.

В процессе производства не используются антимикробные консерванты.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачный или слегка опалесцирующий жидкость желтого, янтарного или зеленоватого цвета. Определение проводят визуально.

Подлинность

Видоспецифичность. В препарате должны присутствовать только белки из сыворотки крови человека. Испытание проводят методом иммуноэлектрофореза в геле с использованием сывороток против белков из сыворотки крови человека, крупного рогатого скота, лошади и свиньи в соответствии с ОФС «Иммуноэлектрофорез в агаровом геле». Допустимо проведение испытания методом иммунодиффузии в геле в соответствии с ОФС «Иммунодиффузия в геле».

Основной белковый компонент. В препаратах должен обнаруживаться основной белковый компонент с подвижностью альбумина человека. Испытание проводят методом электрофореза на ацетате целлюлозы в соответствии с ОФС «Определение однородности лекарственных препаратов из сыворотки крови человека и животных методом электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы».

Гемпигменты. Оптическая плотность испытуемого 1 % водного раствора альбумина при длине волны 403 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм против воды должна быть не более 0,15. Определение проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия».

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Термостабильность. Препарат после прогрева в течение 50 ч при тем-

пературе (56 ± 1) °С должен оставаться без изменений. Определение проводят визуально.

pH. От 6,5 до 7,2. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Фракционный состав. Содержание альбумина должно быть не менее 97 %, а α- и β-глобулинов – не более 3 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение однородности лекарственных препаратов из сыворотки крови человека и животных методом электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы».

Белок.

От 4,5 до 5,5 % для 5 % раствора альбумина.

От 9,0 до 11,0 % для 10 % раствора альбумина.

От 18,0 до 22,0 % для 20 % раствора альбумина.

От 22,5 до 27,5 % для 25 % раствора альбумина.

Определение проводят подходящим методом в соответствии с ОФС «Определение белка».

Полимеры и агрегаты. Содержание полимеров и агрегатов должно быть не более 5,0 %. Определение проводят методом эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография».

Натрия каприлат. Не более 0,23 ммоль/г. Определение проводят методом эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография».

Активатор прекалликреина. Не более 35 МЕ/мл. Определение проводят хромогенным методом.

Алюминий. Не более 200 мкг/л. Определение проводят методом атомно-эмиссионной спектрометрии в соответствии с ОФС «Атомно-эмиссионная спектрометрия».

Натрий-ион. От 90 до 160 ммоль/л. Определение проводят методом

пламенной фотометрии в соответствии с ОФС «Атомно-эмиссионная спектрометрия».

Калий-ион. Не более 0,05 ммоль/г. Определение проводят методом пламенной фотометрии в соответствии с ОФС «Атомно-эмиссионная спектрометрия».

Пирогенность или бактериальные эндотоксины. Препарат должен быть апирогенным или содержание бактериальных эндотоксинов не должно превышать 0,5 ЕЭ/мл для 5 % раствора альбумина, 1,3 ЕЭ для 10 и 20 % растворов альбумина и 1,7 ЕЭ для 25 % раствора альбумина. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Тест-доза для 5 % раствора альбумина составляет 10 мл препарата на 1 кг массы кролика, для 10, 20 и 25 % растворов – 5 мл на 1 кг массы кролика или в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

Стерильность. Препарат должен быть стерильным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Вирусная безопасность

Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg). Препарат не должен содержать поверхностного антигена вируса гепатита В. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих чувствительность не ниже 0,1 МЕ/мл в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу гепатита С. Антитела к вирусу гепатита С должны отсутствовать. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих 100 % чувствительность и специфичность в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Препарат не должен содержать антител к вирусу имму-

нодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) и антиген p24 ВИЧ-1. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих 100 % чувствительность и специфичность в соответствии с инструкциями по применению.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные препараты из плазмы крови человека».

Хранение. При температуре от 2 до 10 °С в защищенном от света месте.

Иммуноглобулин человека нормальный	ФС.3.3.2.0007.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на препараты иммуноглобулина человека нормального для внутримышечного или подкожного введения.

Иммуноглобулин человека нормальный представляет собой иммунологически активную белковую фракцию, содержащую широкий спектр антител, выделенную из плазмы крови человека, основным активным компонентом которой является иммуноглобулин G (Ig G), обладающий активностью антител различной специфичности в отношении различных антигенов.

Препараты иммуноглобулина человека нормального не содержат консерванты и антибиотики.

ПРОИЗВОДСТВО

Для производства препаратов иммуноглобулинов человека нормального для внутривенного введения используется плазма крови, полученная не менее чем от 1000 здоровых доноров, соответствующая требованиям ФС «Плазма человека для фракционирования» методами с доказанной эффективностью выделения иммуноглобулиновой фракции и обеспечения вирусной и специфической безопасности.

Производство иммуноглобулина человека нормального должно осуществляться с соблюдением требований, указанных в ОФС «Иммуноглобулины человека».

Антибактериальная и противовирусная эффективность препаратов должна быть обеспечена соответствующей степенью концентрации антител в процессе производства (не менее, чем в 6 раз).

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачный или слабо опалесцирующий раствор, бесцветный или со светло-желтой окраской (если в нормативной документации не указаны другие требования); в процессе хранения допускается появление незначительного осадка, исчезающего при легком встряхивании. Определение проводят визуально.

Подлинность (видоспецифичность). Подтверждается наличием белков только сыворотки крови человека. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Иммуноэлектрофорез в агаровом геле». Допустимо проведение испытания методом иммунодиффузии в геле в соответствии с ОФС «Иммунодиффузия в геле». В результате испытания должны выявляться линии преципитации только с сывороткой против белков сыворотки крови человека.

Прозрачность. Прозрачный или слегка опалесцирующий раствор с оптической плотностью не более 0,05 (определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей» и ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» в кюветах с толщиной слоя 3 мм при длине волны 540 нм). Метод определения указывают в нормативной документации.

Цветность. Бесцветный или светло-желтый раствор (определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей») или раствор с оптической плотностью не более 0,15 (определение проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» в

кюветах с толщиной слоя 3 мм при длине волны 400 нм). Метод определения указывают в нормативной документации производителя.

Механические включения. Видимые механические включения должны отсутствовать. Определение проводят в соответствии с ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

Извлекаемый объем. Должен быть не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

pH. От 5,0 до 7,4. Испытуемый образец разводят до 1% концентрации 0,9 % раствором натрия хлорида. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Белок. От 9,5 до 16,0%, в зависимости от лекарственной формы. Определение проводят колориметрическим методом с биуретовым реактивом в соответствии с ОФС Количественное определение белка колориметрическим методом с биуретовым реактивом в препаратах крови человека и животных».

Электрофоретическая однородность. Фракция иммуноглобулинов должна составлять не менее 95 % от общего белка. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение однородности лекарственных препаратов из сыворотки крови человека и животных методом электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы».

Молекулярные параметры. Содержание мономеров и димеров должно быть не менее 85%, полимеров и агрегатов – не более 10%. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение молекулярных параметров иммуноглобулинов методом ВЭЖХ».

Фракционный состав. Испытуемый образец разводят до 1% концентрации 0,9% раствором натрия хлорида. Должна выявляться интенсивная линия преципитации IgG и не более четырех дополнительных линий. Определение проводят методом иммуноэлектрофореза в геле с

использованием сыворотки против сывороточных белков крови человека в соответствии с ОФС «Иммуноэлектрофорез в агаровом геле».

Термостабильность. Препарат должен оставаться жидким и не образовывать геля после выдерживания в водяной бане или водяном термостате при температуре (56±1)°С в течение 4 ч.

Стабилизаторы. Проводят количественное определение вносимого(ых) в препарат стабилизатора(ов) методом(ами) в соответствии с ОФС «Газовая хроматография» и/или в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)» (если в нормативной документации не указан другой метод). Допустимый предел содержания стабилизаторов должен быть указан в нормативной документации.

Стерильность. Должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность или **Бактериальные эндотоксины.** Должен быть апирогенным или содержать бактериальные эндотоксины в количестве менее 5 ЕЭ/мл.

Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность» (тест-доза должна составлять 1,0 мл препарата на кг массы кролика) или в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины» методом, указанным в нормативной документации.

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Испытания проводят на 5 здоровых белых мышах массой тела 18-20 г и двух морских свинках массой тела 250-300 г. Тест-доза для белых мышей составляет 0,5 мл (внутрибрюшинно), для морских свинок – 5,0 мл (подкожно в оба бока по 2,5 мл) (если нет других указаний в нормативной документации). Период наблюдения за животными составляет 7 суток.

Содержание антител (специфическая активность**).** Указывают количественное содержание антибактериальных антител (минимум против

одного возбудителя) и противовирусных антител (минимум против одного возбудителя). Определение проводят по методикам, указанным в нормативной документации (например, содержание противокоревых антител – в реакции пассивной гемагглютинации, содержание антиальфастафилолизина – в реакции нейтрализации гемолитических свойств стафилококкового альфатоксина) с использованием стандартных образцов.

Анти-А и анти-В гемагглютинины (для лекарственной формы для подкожного введения)**.** Агглютинация должна отсутствовать в разведении препарата 1:64. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение анти-А и анти-В гемагглютининов в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека».

Анти-D антитела. (для лекарственной формы для подкожного введения). Содержание анти-D антител в препарате должно быть не более, чем в положительном стандартном образце. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Испытание на анти-D антитела в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека».

Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg). Препарат не должен содержать поверхностного антигена вируса гепатита В. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения Российской Федерации и имеющих чувствительность не ниже 0,1 МЕ/мл, в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу гепатита С. Антитела к вирусу гепатита С должны отсутствовать. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения Российской Федерации и имеющих 100 % чувствительность и специфичность, в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Препарат не должен содержать антител к вирусу

иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) и антиген p24 ВИЧ-1. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения Российской Федерации и имеющих 100% чувствительность и специфичность, в соответствии с инструкциями по применению.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные препараты из плазмы крови человека».

На вторичную (потребительскую) упаковку лекарственных средств, должна наноситься надпись: «Антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, к вирусу гепатита С и поверхностный антиген вируса гепатита В отсутствуют».

Хранение. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты». Хранят в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8°С. Замораживание не допускается.

Иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения	ФС.3.3.2.0008.15

Настоящая фармакопейная статья распространяется на препараты иммуноглобулина человека нормального для внутривенного введения.

Иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения представляет собой иммунологически активную белковую фракцию, выделенную из плазмы крови человека, которая содержит широкий спектр антител, основным активным компонентом которой является иммуноглобулин G (Ig G), обладающий активностью в отношении различных антигенов.

Препараты иммуноглобулина человека нормального для внутривенного введения не содержат консерванты и антибиотики.

ПРОИЗВОДСТВО

Для производства препаратов иммуноглобулинов человека нормального для внутривенного введения используется плазма крови, полученная не менее чем от 1000 здоровых доноров, соответствующая требованиям ФС «Плазма человека для фракционирования» методами с доказанной эффективностью выделения иммуноглобулиновой фракции и обеспечения вирусной и специфической безопасности.

Производство иммуноглобулина человека нормального для внутривенного введения должно осуществляться с соблюдением требований, указанных в ОФС «Иммуноглобулины человека».

Антибактериальная и противовирусная эффективность препаратов иммуноглобулина человека нормального для внутривенного введения должна быть обеспечена соответствующей степенью концентрации антител в процессе производства (не менее, чем в 3 раза при содержании белка в препарате 4,5-5,5 % и не менее, чем в 6 раз при содержании белка в препарате 9,0 – 11,0 %).

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачный или слабо опалесцирующий раствор, бесцветный или светло-желтой окраски. Лиофилизированный препарат представляет собой аморфную гигроскопичную массу в виде таблетки или порошка белого цвета, допускается светло-желтая окраска (если в нормативной документации не указаны другие требования). Определение проводят визуально.

Подлинность (видоспецифичность). Подтверждается наличием белков только сыворотки крови человека. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Иммуноэлектрофорез в агаровом геле» Допустимо проведение испытания методом иммунодиффузии в геле в соответствии с ОФС «Иммунодиффузия в геле». В результате испытания должны выявляться линии преципитации только с сывороткой против белков сыворотки крови человека.

Время получения восстановленного препарата. Не более 20 мин (если в нормативной документации нет других указаний). Приводят описание методики с указанием применяемого растворителя, его объема и условий растворения (температура растворителя, необходимость перемешивания и др.).

Прозрачность. Прозрачный или слегка опалесцирующий раствор (определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей») или слегка опалесцирующий раствор с оптической плотностью не более 0,05 (определение проводят в соответствии с ОФС

«Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» в кюветах с толщиной слоя 3 мм при длине волны 540 нм). Метод определения указывают в нормативной документации.

Цветность. Должен быть бесцветным или светло- желтой окраски, не превышающей интенсивность окраски эталонного раствора Y5 (определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей») или раствор с оптической плотностью не более 0,05 (определение проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» в кюветах с толщиной слоя 3 мм при длине волны 400 нм). Метод определения указывают в нормативной документации.

Потеря в массе при высушивании (для лиофилизированных препаратов)**.** Не более 3%. На два параллельных анализа отбирают по 0,15-0,20 г испытуемого образца. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

При получении неудовлетворительных результатов контроль повторяют на удвоенном количестве образцов. При получении неудовлетворительных результатов при повторном испытании препарат бракуют.

Механические включения. Видимые механические включения должны отсутствовать. Определение проводят в соответствии с ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

Извлекаемый объем (для жидких препаратов)**.** Должен быть не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

pH. от 4,0 до 7,4. Испытуемый образец разводят до 1% концентрации 0,9% раствором натрия хлорида. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия». В нормативной документации для сухих лекарственных форм указывают название растворителя, описывают методику восстановления лекарственного средства.

Белок. От 4,5 до 5,5% или от 9,5 до 11,0%. Определение проводят колориметрическим методом с биуретовым реактивом в соответствии с ОФС «Количественное определение белка колориметрическим методом с биуретовым реактивом в препаратах крови человека и животных».

Электрофоретическая однородность. Основная фракция иммуноглобулинов IgG должна составлять не менее 95% от общего белка (если в нормативной документации нет других указаний). Испытание проводят в соответствии с ОФС «Определение однородности лекарственных препаратов из сыворотки крови человека и животных методом электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы».

Молекулярные параметры. Содержание мономеров и димеров иммуноглобулина G должно быть не менее 90%, полимеров и агрегатов – не более 3%. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Определение молекулярных параметров иммуноглобулинов методом ВЭЖХ».

Фракционный состав. Испытуемый образец разводят до 1% концентрации 0,9% раствором натрия хлорида. Должна выявляться интенсивная линия преципитации IgG и не более четырех дополнительных линий. Испытание проводят методом иммуноэлектрофореза в геле с использованием сыворотки против сывороточных белков крови человека в соответствии с ОФС «Иммуноэлектрофорез в агаровом геле».

Содержание иммуноглобулина А. В нормативной документации указывают количественное содержание иммуноглобулина А. Испытание проводят иммунологическими методами с использованием стандартного образца, аттестованного в международных единицах.

Термостабильность (для жидких препаратов). Препарат должен оставаться жидким и не образовывать геля после выдерживания в водяной бане или водяном термостате при температуре (56±1)°С в течение 4 ч.

Стабилизаторы. Проводят количественное определение вносимых в препарат стабилизаторов методами, описанными в ОФС «Газовая

хроматография» и/или ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», если в нормативной документации нет других указаний.

Допустимый предел содержания стабилизаторов должен быть указан в нормативной документации производителя.

Вирусинактивирующие агенты. Проводят количественное определение остаточного содержания в препарате вирусинактивирующих агентов методами, описанными в ОФС «Газовая хроматография» и/или ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», если в нормативной документации нет других указаний. Допустимый предел содержания вирусинактивирующих агентов должен быть указан в нормативной документации производителя.

Осмоляльность. Значение осмоляльности должно быть не менее 240 мОсм/кг. Определение проводят в соответствии с ОФС «Осмолярность».

Стерильность. Препарат должен быть стерильным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность или **Бактериальные эндотоксины.** Должен быть апирогенным или содержать бактериальные эндотоксины в количестве менее 0,5 ЕЭ/мл (при содержании белка в препарате не более 50 г/л) или менее 1,0 ЕЭ/мл (при содержании белка в препарате более 50 г/л).

Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность» (не менее 0,5 г белка иммуноглобулина на 1 кг массы кролика; объем вводимого препарата не должен превышать 10 мл на 1 кг массы кролика) или в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины» методом, указанным в нормативной документации производителя.

Аномальная токсичность. Должен быть нетоксичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Испытания проводят на 5 здоровых белых мышах массой тела 18-20 г и двух морских свинках массой тела 250-300 г. Тест-доза для белых мышей составляет 0,5 мл (внутривенно), для морских свинок – 5,0 мл (подкожно в оба бока по 2,5 мл). Период наблюдения за животными составляет 7 суток.

Содержание антител (специфическая активность). Указывают количественное содержание антибактериальных антител (минимум против одного возбудителя) и противовирусных антител (минимум против одного возбудителя). Определение проводят по методикам, указанным в нормативной документации производителя (например, содержание противокоревых антител – в реакции пассивной гемагглютинации, содержание антиальфастафилолизина – в реакции нейтрализации гемолитических свойств стафилококкового альфатоксина) с использованием стандартных образцов.

Специфическая безопасность

Антикомплементарная активность Допустимый предел связывания комплемента – не более 1 CH_{50}/мг белка, т.е. 1 мг белка иммуноглобулина не должен связывать более 1 CH_{50} комплемента. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение антикомплементарной активности в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека для внутривенного введения».

Анти-А и анти-В гемагглютинины. Агглютинация должна отсутствовать в разведении препарата 1:64. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение анти-А и анти-В гемагглютининов в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека».

Анти-D антитела. Содержание анти-D антител в препарате должно быть не более, чем в положительном стандартном образце. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Испытание на анти-D антитела в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека».

Вирусная безопасность

Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg). Препарат не должен содержать поверхностного антигена вируса гепатита В. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения Российской

Федерации и имеющих чувствительность не ниже 0,1 МЕ/мл, в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу гепатита С. Антитела к вирусу гепатита С должны отсутствовать. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения Российской Федерации и имеющих 100% чувствительность и специфичность, в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Препарат не должен содержать антител к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения Российской Федерации и имеющих 100% чувствительность и специфичность, в соответствии с инструкциями по применению.

Упаковка и Маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные препараты из плазмы крови человека».

На вторичную (потребительскую) упаковку лекарственных средств, должна наноситься надпись: «Антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, к вирусу гепатита С и поверхностный антиген вируса гепатита В отсутствуют».

Хранение. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты». Хранят в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8°С. Замораживание не допускается.

Иммуноглобулин человека противостафилококковый	ФС.3.3.2.0009.18 Взамен ФС 42-3158-95

Настоящая фармакопейная статья распространяется на иммуноглобулин человека противостафилококковый, раствор для внутримышечного введения, применяемый для профилактики и/или лечения стафилококковой инфекции.

Действующим началом препарата является фракция иммуноглобулинов, нейтрализующих стафилококковый экзотоксин (альфастафилолизин).

Препарат не содержат консервантов и антибиотиков.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство иммуноглобулина человека противостафилококкового должно осуществляться с соблюдением требований, указанных в ОФС «Иммуноглобулины человека» и ФС «Иммуноглобулин человека нормальный».

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Бесцветный или со светло-желтой окраской, прозрачный или слабо опалесцирующий раствор. В процессе хранения допускается появление незначительного осадка, исчезающего при легком встряхивании». Определение проводят визуально.

Подлинность. Подтверждается наличием белков только сыворотки крови человека. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Иммуноэлектрофорез в агаровом геле». Допустимо проведение испытания методом иммунодиффузии в геле в соответствии с ОФС «Иммунодиффузия в геле». В результате испытания

должны выявляться линии преципитации только с сывороткой против белков сыворотки крови человека.

Прозрачность. Прозрачный или слегка опалесцирующий раствор (определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей») или раствор с оптической плотностью не более 0,05 (определение проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» в кюветах с толщиной слоя 3 мм при длине волны 540 нм). Метод определения указывают в нормативной документации.

Цветность. Бесцветный или светло-желтый раствор (определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей») или раствор с оптической плотностью не более 0,15 (определение проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» в кюветах с толщиной слоя 3 мм при длине волны 400 нм). Метод определения указывают в нормативной документации.

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

Извлекаемый объем. Должен быть не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

pH. От 6,6 до 7,4. Испытуемый образец разводят до 1% концентрации 0,9 % раствором натрия хлорида. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Белок. От 9,5 до 10,5 %. Определение проводят колориметрическим методом с биуретовым реактивом в соответствии с ОФС «Количественное определение белка колориметрическим методом с биуретовым реактивом в препаратах крови человека и животных» Метод А.

Электрофоретическая однородность. Фракция иммуноглобулинов должна составлять не менее 95 % от общего белка. Испытание проводят в соот-

ветствии с ОФС «Определение однородности лекарственных препаратов из сыворотки крови человека и животных методом электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы».

Молекулярные параметры. Содержание мономеров и димеров должно быть не менее 85 %, полимеров и агрегатов – не более 10 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение молекулярных параметров иммуноглобулинов методом ВЭЖХ».

Фракционный состав. На электрофореграмме должна выявляться интенсивная линия преципитации IgG и не более четырех дополнительных линий. Определение проводят методом иммуноэлектрофореза в геле с использованием сыворотки преципитирующей белки сыворотки крови человека, в соответствии с ОФС «Иммуноэлектрофорез в агаровом геле».

Термостабильность. Препарат должен оставаться жидким и не образовывать геля после выдерживания в водяной бане или водяном термостате при температуре (56±1)°С в течение 4 ч.

Стабилизаторы. Проводят количественное определение вносимого(ых) в препарат стабилизатора(ов) (мальтозы, глюкозы, пролина, глицина, и др.) методом(ами) в соответствии с ОФС «Газовая хроматография» и/или в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», если в нормативной документации не указан другой метод. Допустимый предел содержания стабилизаторов должен быть указан в нормативной документации.

Стерильность. Должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность», методом, указанным в нормативной документации.

Пирогенность или **Бактериальные эндотоксины.** Должен быть апирогенным или содержать бактериальные эндотоксины в количестве менее 5 ЕЭ/мл.

Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность» (тест-доза должна составлять 1,0 мл препарата на кг массы кролика) или в соответствии с

ОФС «Бактериальные эндотоксины» методом, указанным в нормативной документации.

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Испытания проводят на 5 здоровых белых мышах массой тела 18-20 г и двух морских свинках массой тела 250-300 г. Тест-доза для белых мышей составляет 0,5 мл (внутрибрюшинно), для морских свинок – 5,0 мл (подкожно в оба бока по 2,5 мл) (если нет других указаний в нормативной документации). Период наблюдения за животными составляет 7 сут.

Специфическая активность. В 1 мл препарата должно содержаться не менее 20 МЕ антиальфастафилолизина. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания антиальфастафилолизина (специфических антител) в лекарственных препаратах из сыворотки крови человека и животных».

Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg). Препарат не должен содержать поверхностного антигена вируса гепатита В. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих чувствительность не ниже 0,1 МЕ/мл в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу гепатита С. Антитела к вирусу гепатита С должны отсутствовать. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих 100 % чувствительность и специфичность в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Препарат не должен содержать антител к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих 100 % чувствительность и специфичность в соответствии с инструкциями по применению.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные препараты из плазмы крови человека».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С в соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств» и ОФС «Хранение лекарственных средств». Замораживание не допускается.

Иммуноглобулин человека противостолбнячный	ФС.3.3.2.00010.18 Вводится впервые

Настоящая фармакопейная статья распространяется на иммуноглобулин человека противостолбнячный для внутримышечного введения, применяемый для экстренной профилактики столбняка у детей и взрослых.

Действующим началом препарата являются иммуноглобулины класса G (Ig G), способные нейтрализовать столбнячный токсин.

Препарат иммуноглобулина человека противостолбнячный не содержат консервантов и антибиотиков.

ПРОИЗВОДСТВО

Для производства иммуноглобулина человека противостолбнячного используется плазма крови здоровых доноров, иммунизированных столбнячным анатоксином. Производство иммуноглобулина человека противостолбнячного должно осуществляться с соблюдением требований, указанных в ОФС «Иммуноглобулины человека» и ФС «Иммуноглобулин человека нормальный».

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачный или слабо опалесцирующий раствор, бесцветный или со светло-желтой окраской. В процессе хранения допускается появление незначительного осадка, исчезающего при легком встряхивании. Определение проводят визуально.

Подлинность. Подтверждается наличием белков только сыворотки крови человека. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Иммуноэлектрофорез в агаровом геле» Допустимо проведение испытания методом иммунодиффузии в геле в соответствии с ОФС «Иммунодиффузия в геле». В результате испытания должны выявляться линии преципитации только с сывороткой против белков сыворотки крови человека.

Прозрачность. Прозрачный или слегка опалесцирующий раствор (определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей») или раствор с оптической плотностью не более 0,05 (определение проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» в кюветах с толщиной слоя 3 мм при длине волны 540 нм). Метод определения указывают в нормативной документации.

Цветность. Бесцветный или светло-желтый раствор (определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей») или раствор с оптической плотностью не более 0,15 (определение проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» в кюветах с толщиной слоя 3 мм при длине волны 400 нм). Метод определения указывают в нормативной документации.

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

Извлекаемый объем. Должен быть не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

pH. От 6,6 до 7,4. Испытуемый образец разводят до 1% концентрации 0,9 % раствором натрия хлорида. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Белок. От 10,0 до 16 %. Определение проводят колориметрическим методом с биуретовым реактивом в соответствии с ОФС «Количественное определение белка колориметрическим методом с биуретовым реактивом в препаратах крови человека и животных» Метод А.

Электрофоретическая однородность. Фракция иммуноглобулинов должна составлять не менее 95 % от общего белка. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Определение однородности лекарственных препаратов из сыворотки крови человека и животных методом электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы».

Молекулярные параметры. Содержание мономеров и димеров должно быть не менее 85 %, полимеров и агрегатов – не более 10 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение молекулярных параметров иммуноглобулинов методом ВЭЖХ».

Фракционный состав. На электрофореграмме должна выявляться интенсивная линия преципитации IgG и не более четырех дополнительных линий. Определение проводят методом иммуноэлектрофореза в геле с использованием сыворотки преципитирующей белки сыворотки крови человека, в соответствии с ОФС «Иммуноэлектрофорез в агаровом геле».

Термостабильность. Препарат должен оставаться жидким и не образовывать геля после выдерживания в водяной бане или водяном термостате при температуре (56±1)°С в течение 4 ч.

Стабилизаторы. Проводят количественное определение вносимого(ых) в препарат стабилизатора(ов) (мальтозы, глюкозы, пролина, глицина, и др.) методом(ами) в соответствии с ОФС «Газовая хроматография» и/или в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография» (если в нормативной документации не указан другой метод). Допустимый предел содержания стабилизаторов должен быть указан в нормативной документации.

Стерильность. Должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность или **Бактериальные эндотоксины.** Должен быть апирогенным или содержать бактериальные эндотоксины в количестве менее 5 ЕЭ/мл.

Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность» (тест-доза должна составлять 1,0 мл препарата на кг массы кролика) или в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины» методом, указанным в нормативной документации.

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Испытания проводят на 5 здоровых белых мышах массой тела 18-20 г и двух морских свинках массой тела 250-300 г. Тест-доза для белых мышей составляет 0,5 мл (внутрибрюшинно), для морских свинок – 5,0 мл (подкожно в оба бока по 2,5 мл) (если нет других указаний в нормативной документации). Период наблюдения за животными составляет 7 сут.

Содержание антител (специфическая активность). В 1 мл препарата должно содержаться не менее 100 МЕ антител к столбнячному токсину или 1 доза препарата должна содержать не менее 250 МЕ антител нейтрализующих столбнячный токсин. Определение проводят в реакции нейтрализации столбнячного токсина на белых мышах по методике, указанной в нормативной документации, с использованием стандартного образца, аттестованного в международных единицах.

Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg). Препарат не должен содержать поверхностного антигена вируса гепатита В. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих чувствительность не ниже 0,1 МЕ/мл в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу гепатита С. Антитела к вирусу гепатита С должны отсутствовать. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике

здравоохранения России и имеющих 100 % чувствительность и специфичность в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Препарат не должен содержать антител к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих 100 % чувствительность и специфичность в соответствии с инструкциями по применению.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные препараты из плазмы крови человека».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С в соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств» и ОФС «Хранение лекарственных средств». Замораживание не допускается.

Иммуноглобулин человека против гепатита В для внутривенного введения	ФС.3.3.2.00011.18 Взамен ФС 42-330ВС-90

Настоящая фармакопейная статья распространяется на иммуноглобулин человека против гепатита В для внутривенного введения. Действующим началом препарата являются антитела, блокирующие поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) и предотвращающие проникновение вирусных частиц в клетки печени.

Препарат предназначен для экстренной профилактики гепатита В у детей и взрослых, а также для лечения легких и среднетяжелых форм острого вирусного гепатита В у взрослых.

Препарат не содержат консервантов и антибиотиков.

ПРОИЗВОДСТВО

Для производства иммуноглобулина человека против гепатита В для внутривенного введения используется плазма крови здоровых доноров, протестированная на наличие маркеров инфекций, передающихся с кровью и соответствующая требованиям ФС «Плазма человека для фракционирования», содержащая антитела к поверхностному антигену (HBsAg) вируса гепатита В.

Препарат иммуноглобулина человека против гепатита В для внутривенного введения представляет собой концентрированный раствор очищенной иммунологически активной фракции иммуноглобулинов G (Ig G), обладающей активностью антител к поверхностному антигену вируса гепатита

В (HBsAg), выделенный методом фракционирования этиловым спиртом при температуре ниже 0° С из плазмы крови здоровых доноров.

Производство иммуноглобулина человека против гепатита В для внутривенного введения должно осуществляться с соблюдением требований, указанных в ОФС «Иммуноглобулины человека» и ФС «Иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения».

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачный или слабо опалесцирующий раствор, бесцветный или светло-желтой окраски. В процессе хранения допускается появление незначительного осадка, исчезающего при легком встряхивании. Определение проводят визуально.

Подлинность. Подтверждается наличием белков только сыворотки крови человека. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Иммуноэлектрофорез в агаровом геле» Допустимо проведение испытания методом иммунодиффузии в геле в соответствии с ОФС «Иммунодиффузия в геле». В результате испытания должны выявляться линии преципитации только с сывороткой против белков сыворотки крови человека.

Прозрачность. Прозрачный или слегка опалесцирующий раствор (определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей») или слегка опалесцирующий раствор с оптической плотностью не более 0,05 (определение проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» в кюветах с толщиной слоя 3 мм при длине волны 540 нм). Метод определения указывают в нормативной документации.

Цветность. Бесцветный или светло- желтый раствор, не превышающий интенсивность окраски эталонного раствора Y5 (определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей») или раствор с оптической плотностью не более 0,05 (определение проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» в кюветах с

толщиной слоя 3 мм при длине волны 400 нм). Метод определения указывают в нормативной документации.

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

Извлекаемый объем. Должен быть не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

pH. От 4,0 до 7,4. Испытуемый образец разводят до 1% концентрации 0,9 % раствором натрия хлорида. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия». Для сухих лекарственных форм указывают название растворителя, описывают методику восстановления лекарственного средства.

Белок. От 4,5 до 5,5 % или от 9,5 % до 11 %. Определение проводят колориметрическим методом с биуретовым реактивом в соответствии с ОФС «Количественное определение белка колориметрическим методом с биуретовым реактивом в препаратах крови человека и животных» Метод А.

Электрофоретическая однородность. Основная фракция иммуноглобулинов IgG должна составлять не менее 95 % от общего белка. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Определение однородности лекарственных препаратов из сыворотки крови человека и животных методом электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы».

Молекулярные параметры. Содержание мономеров и димеров иммуноглобулина G должно быть не менее 90 %, полимеров и агрегатов – не более 3 %. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Определение молекулярных параметров иммуноглобулинов методом ВЭЖХ».

Фракционный состав. Должна выявляться интенсивная линия преципитации IgG и не более четырех дополнительных линий. Определение проводят методом иммуноэлектрофореза в геле с использованием сыворотки

против белков сыворотки крови человека в соответствии с ОФС «Иммуноэлектрофорез в агаровом геле».

Термостабильность. Препарат должен оставаться жидким и не образовывать геля после выдерживания в водяной бане или водяном термостате при температуре (56±1)°С в течение 4 ч.

Стабилизаторы. Проводят количественное определение вносимого(ых) в препарат стабилизатора(ов) (мальтозы, глюкозы, пролина, глицина, и др.) методом(ами) в соответствии с ОФС «Газовая хроматография» и/или в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография» (если в нормативной документации не указан другой метод). Допустимый предел содержания стабилизаторов должен быть указан в нормативной документации.

Вирусинактивирующие агенты. Проводят количественное определение остаточного содержания в препарате вирусинактивирующих агентов (три-н-бутилфосфата, тритона Х-100, октоксинола, полиэтиленгликоля, натрия холата, полисорбата-80, ß-пропиолактона и др.) методами, в соответствии с ОФС «Газовая хроматография» и/или ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», если в нормативной документации нет других указаний. Допустимый предел содержания вирусинактивирующих агентов должен быть указан в нормативной документации.

Осмоляльность. Не менее 240 мОсм/кг. Определение проводят в соответствии с ОФС «Осмолярность».

Стерильность. Должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность или **Бактериальные эндотоксины.** Должен быть апирогенным или содержать бактериальные эндотоксины в количестве менее 0,5 ЕЭ/мл (при содержании белка в препарате не более 50 г/л) или менее 1,0 ЕЭ/мл (при содержании белка в препарате более 50 г/л).

Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность» (не менее 0,5 г белка иммуноглобулина на 1 кг массы кролика; объем вводимого препарата

не должен превышать 10 мл на 1 кг массы кролика) или в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины» методом, указанным в нормативной документации.

Аномальная токсичность. Должен быть нетоксичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Испытания проводят на 5 здоровых белых мышах массой тела 18-20 г и двух морских свинках массой тела 250-300 г. Тест-доза для белых мышей составляет 0,5 мл (внутрибрюшинно), для морских свинок – 5,0 мл (подкожно в оба бока по 2,5 мл). Период наблюдения за животными составляет 7 сут.

Содержание антител (специфическая активность). В 1 мл препарата должно содержаться не менее 50 МЕ/мл антител к HBsAg вируса гепатита В или 1 доза препарата должна содержать не менее 100 МЕ антител к поверхностному антигену вируса гепатита В.

Определение проводят методом ИФА с тест-системами, разрешенными к применению в РФ, имеющими чувствительность не ниже 10 МЕ/л в соответствии с прилагаемыми инструкциями по применению, с использованием стандартного образца, аттестованного в международных единицах.

Специфическая безопасность

Антикомплементарная активность. Допустимый предел связывания комплемента – не более 1 CH_{50}/мг белка, т.е. 1 мг белка иммуноглобулина не должен связывать более 1 CH_{50} комплемента. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение антикомплементарной активности в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека для внутривенного введения».

Анти-А и анти-В гемагглютинины. Агглютинация должна отсутствовать в разведении препарата 1:64. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение анти-А и анти-В гемагглютининов в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека».

Анти-D антитела. Содержание анти-D антител в препарате должно быть не более, чем в положительном стандартном образце. Испытания проводят в

соответствии с ОФС «Испытание на анти-D антитела в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека».

Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg). Препарат не должен содержать поверхностного антигена вируса гепатита В. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих чувствительность не ниже 0,1 МЕ/мл в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу гепатита С. Антитела к вирусу гепатита С должны отсутствовать. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих 100 % чувствительность и специфичность в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Препарат не должен содержать антител к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих 100 % чувствительность и специфичность в соответствии с инструкциями по применению.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные препараты из плазмы крови человека».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С в соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств» и ОФС «Хранение лекарственных средств». Замораживание не допускается.

Иммуноглобулин человека против гепатита В для внутримышечного введения

ФС 3.3.2.00012.18

Взамен ФС 42-330ВС-90

Настоящая фармакопейная статья распространяется на иммуноглобулин человека против гепатита В для внутримышечного введения. Действующим началом препарата являются антитела, блокирующие поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) и предотвращающие проникновение вирусных частиц в клетки печени.

Препарат предназначен для экстренной профилактики гепатита В у детей и взрослых, а также для лечения легких и среднетяжелых форм острого вирусного гепатита В у взрослых.

Препарат не содержат консервантов и антибиотиков.

ПРОИЗВОДСТВО

Для производства иммуноглобулина человека против гепатита В используют плазму крови здоровых доноров, иммунизированных вакциной против гепатита В. Производство иммуноглобулинов человека против гепатита В для внутримышечного введения должно осуществляться с соблюдением требований, указанных в ОФС «Иммуноглобулины человека», ФС «Иммуноглобулин человека нормальный».

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачный или слабо опалесцирующий раствор, бесцветный или со светло-желтой окраской. В процессе хранения допускается появление незначительного осадка, исчезающего при легком встряхивании. Определение проводят визуально.

Подлинность. Подтверждается наличием белков только сыворотки крови человека. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Иммуноэлектрофорез в агаровом геле» Допустимо проведение испытания методом иммунодиффузии в геле в соответствии с ОФС «Иммунодиффузия в геле» В результате испытания должны выявляться линии преципитации только с сывороткой против белков сыворотки крови человека.

Прозрачность. Прозрачный или слегка опалесцирующий раствор с оптической плотностью не более 0,05 (определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей» или в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» в кюветах с толщиной слоя 3 мм при длине волны 540 нм). Метод определения указывают в нормативной документации.

Цветность. Бесцветный или светло-желтый раствор (определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей») или раствор с оптической плотностью не более 0,15 (определение проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» в кюветах с толщиной слоя 3 мм при длине волны 400 нм). Метод определения указывают в нормативной документации.

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

Извлекаемый объем. Должен быть не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

pH. От 6,6 до 7,4. Испытуемый образец разводят до 1% концентрации 0,9 % раствором натрия хлорида. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Белок. От 9,5 до 16,0 %. Определение проводят колориметрическим методом с биуретовым реактивом в соответствии с ОФС «Количественное определение белка колориметрическим методом с биуретовым реактивом в препаратах крови человека и животных» Метод А.

Электрофоретическая однородность. Основная фракция иммуноглобулинов IgG должна составлять не менее 95 % от общего белка. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Определение однородности лекарственных препаратов из сыворотки крови человека и животных методом электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы».

Молекулярные параметры. Содержание мономеров и димеров должно быть не менее 85 %, полимеров и агрегатов – не более 10 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение молекулярных параметров иммуноглобулинов методом ВЭЖХ».

Фракционный состав. На электрофореграмме должна выявляться интенсивная линия преципитации IgG и не более четырех дополнительных линий. Определение проводят методом иммуноэлектрофореза в геле с использованием сыворотки преципитирующей белки сыворотки крови человека, в соответствии с ОФС «Иммуноэлектрофорез в агаровом геле».

Термостабильность. Препарат должен оставаться жидким и не образовывать геля после выдерживания в водяной бане или водяном термостате при температуре (56±1)°С в течение 4 ч.

Стабилизаторы. Проводят количественное определение вносимого(ых) в препарат стабилизатора(ов) (мальтозы, глюкозы, пролина, глицина, и др.) методом(ами) в соответствии с ОФС «Газовая хроматография» и/или в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография» (если в нормативной документации не указан другой метод). Допустимый предел содержания стабилизаторов должен быть указан в нормативной документации.

Вирусинактивирующие агенты. Проводят количественное определение остаточного содержания в препарате вирусинактивирующих агентов (три-н-бутилфосфата, тритона Х-100, октоксинола, полиэтиленгликоля, натрия холата, полисорбата-80, ß-пропиолактона и др.) методами, в соответствии с ОФС «Газовая хроматография» и/или ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», если в нормативной документации нет других указаний. Допустимый предел содержания вирусинактивирующих агентов должен быть указан в нормативной документации.

Стерильность. Должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность или **Бактериальные эндотоксины.** Должен быть апирогенным или содержать бактериальные эндотоксины в количестве менее 5 ЕЭ/мл.

Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность» (тест-доза должна составлять 1,0 мл препарата на кг массы кролика) или в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины» методом, указанным в нормативной документации.

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Испытания проводят на 5 здоровых белых мышах массой тела 18-20 г и двух морских свинках массой тела 250-300 г. Тест-доза для белых мышей составляет 0,5 мл (внутрибрюшинно), для морских свинок – 5,0 мл (подкожно в оба бока по 2,5 мл) (если нет других указаний в нормативной документации). Период наблюдения за животными составляет 7 сут.

Содержание антител (специфическая активность). В 1 мл препарата должно содержаться не менее 100 МЕ/мл антител к HBsAg вируса гепатита В или 1 доза препарата должна содержать не менее 100 МЕ антител к поверхностному антигену вируса гепатита В.

Определение проводят методом ИФА с тест-системами, разрешенными к применению в РФ, имеющими чувствительность не ниже 10 МЕ/л в соответствии с прилагаемыми инструкциями по применению, с использованием стандартного образца, аттестованного в международных единицах.

Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg). Препарат не должен содержать поверхностного антигена вируса гепатита В. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих чувствительность не ниже 0,1 МЕ/мл в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу гепатита С. Антитела к вирусу гепатита С должны отсутствовать. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих 100 % чувствительность и специфичность в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Препарат не должен содержать антител к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих 100 % чувствительность и специфичность в соответствии с инструкциями по применению.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные препараты из плазмы крови человека».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С в соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств» и ОФС «Хранение лекарственных средств». Замораживание не допускается.

Иммуноглобулин человека противоаллергический	ФС.3.3.2.0013.18 Взамен ФС 42-3354-97

Настоящая фармакопейная статья распространяется на иммуноглобулин человека противоаллергический для внутримышечного введения.

Действующим началом препарата являются иммуноглобулины класса G, оказывающие выраженное противоаллергическое действие.

Препарат предназначен для лечения заболеваний, обусловленных аллергической реакцией немедленного типа, у взрослых и детей.

Препарат не содержит консервантов и антибиотиков.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство иммуноглобулина человека противоаллергического должно осуществляться с соблюдением требований, указанных в ОФС «Иммуноглобулины человека» и ФС «Иммуноглобулин человека нормальный».

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Бесцветный или со светло-желтой окраской, прозрачный или слабо опалесцирующий раствор. В процессе хранения допускается появление незначительного осадка, исчезающего при легком встряхивании. Определение проводят визуально.

Подлинность. Подтверждается наличием белков только сыворотки крови человека. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Иммуноэлектрофорез в агаровом геле». Допустимо проведение испытания методом иммунодиффузии в геле в соответствии с ОФС «Иммунодиффузия в геле». В результате испытания

должны выявляться линии преципитации только с сывороткой против белков сыворотки крови человека.

Прозрачность. Прозрачный или слегка опалесцирующий раствор с оптической плотностью не более 0,05 (определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей» и ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» в кюветах с толщиной слоя 3 мм при длине волны 540 нм). Метод определения указывают в нормативной документации.

Цветность. Бесцветный или светло-желтый раствор (определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей») или раствор с оптической плотностью не более 0,15 (определение проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» в кюветах с толщиной слоя 3 мм при длине волны 400 нм). Метод определения указывают в нормативной документации.

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

Извлекаемый объем. Должен быть не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

pH. От 6,6 до 7,4. Испытуемый образец разводят до 1% концентрации 0,9 % раствором натрия хлорида. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Белок. От 9,5 до 10,5 %. Определение проводят колориметрическим методом с биуретовым реактивом в соответствии с ОФС «Количественное определение белка колориметрическим методом с биуретовым реактивом в препаратах крови человека и животных» Метод А.

Электрофоретическая однородность. Фракция иммуноглобулинов должна составлять не менее 95 % от общего белка. Испытание проводят в

соответствии с ОФС «Определение однородности лекарственных препаратов из сыворотки крови человека и животных методом электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы».

Молекулярные параметры. Содержание мономеров должно быть не менее 80 %, димеров не более 15 %, фрагментов не более 5 %, полимеры должны отсутствовать. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение молекулярных параметров иммуноглобулинов методом ВЭЖХ».

Фракционный состав. На электрофореграмме должна выявляться интенсивная линия преципитации IgG и не более четырех дополнительных линий. Определение проводят методом иммуноэлектрофореза в геле с использованием сыворотки против белков сыворотки крови человека в соответствии с ОФС «Иммуноэлектрофорез в агаровом геле».

Термостабильность. Препарат должен оставаться жидким и не образовывать геля после выдерживания в водяной бане или водяном термостате при температуре (56±1)°С в течение 4 ч.

Стабилизаторы. Проводят количественное определение вносимого(ых) в препарат стабилизатора(ов) (мальтозы, глюкозы, пролина, глицина, и др.) методом(ами) в соответствии с ОФС «Газовая хроматография» и/или в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», если в нормативной документации не указан другой метод. Допустимый предел содержания стабилизаторов должен быть указан в нормативной документации.

Стерильность. Должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность или **бактериальные эндотоксины.** Должен быть апирогенным или содержать бактериальные эндотоксины в количестве менее 5 ЕЭ/мл.

Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность» (тест-доза должна составлять 1,0 мл препарата на кг массы кролика) или в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины» методом, указанным в нормативной документации.

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Испытания проводят на 5 здоровых белых мышах массой тела 18-20 г и двух морских свинках массой тела 250-300 г. Тест-доза для белых мышей составляет 0,5 мл (внутрибрюшинно), для морских свинок – 5,0 мл (подкожно в оба бока по 2,5 мл) (если нет других указаний в нормативной документации). Период наблюдения за животными составляет 7 сут.

Специфическая активность. Должен обеспечивать защиту 100 % животных от смертельного анафилактического шока. Определение проводят биологическим методом, вызывая пассивную системную анафилаксию у морских свинок по методике, указанной в нормативной документации.

Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg). Препарат не должен содержать поверхностного антигена вируса гепатита В. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих чувствительность не ниже 0,1 МЕ/мл в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу гепатита С. Антитела к вирусу гепатита С должны отсутствовать. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих 100 % чувствительность и специфичность в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Препарат не должен содержать антител к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих 100 % чувствительность и специфичность в соответствии с инструкциями по применению.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные препараты из плазмы крови человека».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С в соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств» и ОФС «Хранение лекарственных средств». Замораживание не допускается.

Антитромбин III человека ФС.3.3.2.0014.18

Вводится впервые

Настоящая фармакопейная статья распространяется на препараты антитромбина III человека, полученные из плазмы крови человека для фракционирования.

Антитромбин III человека представляет собой гликопротеиновую фракцию плазмы крови человека, обладающую способностью инактивировать тромбин в присутствии избытка гепарина.

Препараты антитромбина III человека не содержат консерванты и антибиотики.

ПРОИЗВОДСТВО

Для производства препаратов антитромбина III человека используют плазму крови здоровых доноров, соответствующую требованиям ФС «Плазма человека для фракционирования».

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Аморфная гигроскопичная масса или порошка белого или бледно-желтого цвета (если в нормативной документации нет других указаний). Определение проводят визуально.

Восстановленный раствор. Прозрачный или слегка опалесцирующий бесцветный или светло-желтой окраски раствор. Определение проводят визуально.

Подлинность

Видоспецифичность. Подтверждается наличием белков только сыворотки крови человека. Испытание проводят методом иммуноэлектрофореза в геле с использованием сывороток против белков сыворотки крови человека, крупного рогатого скота, лошади и свиньи в соответствии с ОФС «Иммуноэлектрофорез в агаровом геле». Допустимо проведение испытания методом иммунодиффузии в геле в соответствии с ОФС «Иммунодиффузия в геле». В результате испытания должны выявляться линии преципитации только с сывороткой против белков сыворотки крови человека.

Антитромбин III. Подтверждается наличием активности антитромбина III. Испытание проводят хромогенным методом в соответствии с ОФС «Определение активности факторов свертывания крови».

Время получения восстановленного препарата. Не более 10 мин (если в нормативной документации нет иных указаний). Приводят описание методики с указанием применяемого растворителя, его объема и условий растворения (температура растворителя, необходимость перемешивания и др.).

Вода. Не более 2,0 %. Определение проводят методом К.Фишера в соответствии с ОФС «Определение воды» (если в нормативной документации нет иных указаний). Метод определения и необходимое для испытаний количество образца указывают в нормативной документации.

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH. от 6,0 до 7,5. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Осмоляльность. Не менее 240 мОсм/кг. Определение проводят в соответствии с ОФС «Осмолярность».

Белок. Количественное содержание белка в расчете на 1 флакон или 1 мл восстановленного раствора указывают в нормативной документации. Опреде-

ление проводят в соответствии с ОФС «Определение белка» любым подходящим методом.

Гепарин. Не более 0,1 МЕ на 1 МЕ антитромбина III. Определение проводят хромогенным методом в соответствии с ОФС «Определение активности факторов свертывания крови». Методика должна быть валидирована для конкретного препарата с учетом влияния антитромбина III на результат определения.

Активность антитромбина III человека. Не менее 25 МЕ на 1 мл восстановленного препарата. Определение проводят хромогенным методом в соответствии с ОФС «Определение активности факторов свертывания крови».

Специфическая активность. Должна составлять не менее 3 МЕ на мг белка (при отсутствии стабилизаторов белковой природы).

Специфическую активность препарата в МЕ на мг белка рассчитывают по формуле:

$$\text{Специфическая активность} = \frac{\text{Активность антитромбина III (МЕ/мл)}}{\text{Содержание белка (мг/мл)}}$$

Стабилизатор(ы). (альбумин, натрия цитрат, гепарин и др). Проводят количественное определение вносимого(ых) в препарат стабилизатора(ов) в соответствии с ОФС «Газовая хроматография» и/или ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», если в нормативной документации нет других указаний.

Допустимый предел содержания стабилизатора(ов) должен быть указан в нормативной документации.

Вирусинактивирующие агенты. Проводят количественное определение остаточного содержания в препарате вирусинактивирующего(их) агента(ов) в соответствии с ОФС «Газовая хроматография» и/или ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», если в нормативной документации нет других

указаний. Допустимый предел содержания вирусинактивирующего(их) агента(ов) должен быть указан в нормативной документации.

Стерильность. Препарат должен быть стерильным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность или бактериальные эндотоксины. Должен быть апирогенным или содержать бактериальные эндотоксины в количестве менее 0,1 ЕЭ на 1 МЕ антитромбина III.

Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность» (не менее 50 МЕ антитромбина III на 1 кг массы животного; объем вводимого препарата не должен превышать 10 мл на 1 кг массы животного) или с ОФС «Бактериальные эндотоксины» методом, указанным в нормативной документации.

Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg). Препарат не должен содержать поверхностного антигена вируса гепатита В. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих чувствительность не ниже 0,1 МЕ/мл в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу гепатита С. Антитела к вирусу гепатита С должны отсутствовать. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих 100 % чувствительность и специфичность в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Препарат не должен содержать антител к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих 100 % чувствительность и специфичность в соответствии с инструкциями по применению.

Упаковка и маркировка. В соответствии ОФС «Лекарственные препараты из плазмы крови человека».

Транспортирование и хранение. В соответствии с ОФС «Лекарственные препараты из плазмы крови человека» в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.

Иммуноглобулин противосибиреязвенный из сыворотки крови лошади	ФС.3.3.2.0015.18 Взамен ФС 42-3770-99

Настоящая фармакопейная статья распространяется на иммуноглобулин противосибиреязвенный лошадиный, раствор для внутримышечного введения, применяемый для экстренной профилактики и лечения сибирской язвы у людей.

Действующим началом препарата являются иммуноглобулины класса G лошади, обладающие антибактериальным действием против возбудителя сибирской язвы и антитоксическим действием против сибиреязвенного токсина.

Иммуноглобулин противосибиреязвенный лошадиный выпускается в комплекте с иммуноглобулином противосибиреязвенным лошадиным, разведенным 1:100.

Препараты иммуноглобулина противосибиреязвенного лошадиного не содержат консервантов и антибиотиков.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство иммуноглобулина противосибиреязвенного лошадиного должно осуществляться с соблюдением требований, указанных в ОФС «Иммуноглобулины и сыворотки (антитела) гетерологичные».

Для производства иммуноглобулина противосибиреязвенного используется сыворотка крови лошадей, иммунизированных вегетативными клетками

штаммов *Bacillus anthracis* СТИ-1 и Ихтиман (КСМ-2-4) и сибиреязвенным экзотоксином штамма B. *anthracis* СТИ-1.

Штаммы должны иметь типичные культуральные, морфологические, биохимические и генетические свойства; обладать определенной остаточной вирулентностью, индексом иммунитета и специфической безопасностью для кроликов.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачная или слегка опалесцирующая, бесцветная или светло-желтого цвета жидкость. Определение проводят визуально.

Подлинность. Подтверждается наличием белков только сыворотки крови лошади. Испытание проводят методом иммуноэлектрофореза в геле с использованием сывороток против белков сыворотки крови человека, крупного рогатого скота, лошади и свиньи в соответствии с ОФС «Иммуноэлектрофорез в агаровом геле». Допустимо проведение испытания методом иммунодиффузии в геле в соответствии с ОФС «Иммунодиффузия в геле». В результате испытания должны выявляться линии преципитации только с сывороткой против белков сыворотки крови лошади.

Прозрачность. Прозрачный или слегка опалесцирующий раствор с оптической плотностью не более 0,05 (определение проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» в кюветах с толщиной слоя 3 мм при длине волны 540 нм).

Цветность. Бесцветный или светло-желтый раствор с оптической плотностью не более 0,15 (определение проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» в кюветах с толщиной слоя 3 мм при длине волны 400 нм).

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

Извлекаемый объем. Должен быть не менее номинального (не менее 10 мл). Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем»

pH. От 7,0 до 7,4. Испытуемый образец разводят до 1 % концентрации 0,9 % раствором натрия хлорида. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Белок. От 8 % до 10 %. Определение проводят колориметрическим методом с биуретовым реактивом в соответствии с ОФС «Количественное определение белка колориметрическим методом с биуретовым реактивом в препаратах крови человека и животных». Метод А.

Электрофоретическая однородность. Не менее 95 % гамма- и бета-глобулинов, из них гамма-глобулинов – не менее 80 %, альфа-глобулинов - не более 5 %. Наличие альбумина не допускается. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение однородности лекарственных препаратов из сыворотки крови человека и животных методом электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы».

Молекулярные параметры. Содержание мономеров и димеров иммуноглобулина G должно быть не менее 85 %, полимеров и агрегатов – не более 15 %, фрагменты должны отсутствовать. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Определение молекулярных параметров иммуноглобулинов методом ВЭЖХ».

Термостабильность. Препарат должен оставаться жидким и не образовывать геля после выдерживания в водяной бане или водяном термостате при температуре (56±1)°С в течение 4 ч.

Стерильность. Должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность. Должен быть апирогенным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность» (тест-доза должна составлять 1,0 мл препарата на кг массы кролика).

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Испыта-

ния проводят на 5 здоровых белых мышах массой тела 18-20 г и двух морских свинках массой тела 250-300 г. Тест-доза для белых мышей составляет 0,5 мл (внутрибрюшинно), для морских свинок – 5,0 мл (подкожно в оба бока по 2,5 мл). Период наблюдения за животными составляет 7 сут.

Специфическая активность. Препарат должен давать положительную реакцию диффузной преципитации (РДП) с сибиреязвенным цитоплазматическим антигеном (ЦПА) в разведении не менее 1:60. Должен защищать от гибели не менее 4 из 6 морских свинок при введении им 50 LD_{50} штамма *B. anthracis* 71/12.

1. Активность в РДП с сибиреязвенным ЦПА.

Приготовление сибиреязвенного ЦПА. В бульон Хоттингера pH 7,2±0,1 высевают споровую культуру штамма *B. anthracis* СТИ-1 из расчета не менее 20 млн живых спор в 1 мл (определение проводят в соответствии с ОФС «Определение концентрации микробных клеток») и инкубируют в термостате при температуре (37±1) ºС в течение (21±3) ч. В бульоне должен наблюдаться рост культуры у дна пробирки в виде ватных хлопьев и взвешенных комков, не должен вызывать помутнения среды. Полученную бульонную культуру по (9±1) мл высевают на один матрац с 3 % агаром Хоттингера pH 7,2±0,1 с аминным азотом (2,2±0,2) %. Покачиванием матраца поверхность агара равномерно увлажняют бульонной культурой. Матрацы в вертикальном положении инкубируют в термостате при температуре (35,5±0,5) ºС в течение 24 ч. Затем из матрацев удаляют остатки бульонной культуры и конденсата. Агаровую культуру смывают 50 мл 0,9 % раствором натрия хлорида. Надосадочную жидкость удаляют, осадок ресуспендируют стерильным 12 % раствором натрия хлорида до концентрации (8,5±0,5) млрд клеток в 1 мл суспензии. Полученную суспензию выдерживают при температуре (21±1) ºС в течение 10 сут при периодическом перемешивании. Для консервации к суспензии бактерий добавляют тиомерсал в концентрации 1:20000. Через 10 сут суспензию центрифугируют при 1000 g в течение 20 мин и надосадочную жидкость используют в качестве антигена.

Активность ЦПА определяют с иммуноглобулином противосибиреязвенным лошадиным, действующего срока годности. Титр ЦПА должен составлять не менее 1:8.

Примечания

Приготовление 1/15 М фосфатного буферного раствора pH 7,2-7,3.

Приготовление 0,052 М раствора калия фосфорнокислого однозамещенного (KH_2PO_4). В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 9,07 г калия фосфорнокислого однозамещенного, растворяют в воде очищенной, перемешивают, доводят объем раствора водой до метки и вновь перемешивают.

Приготовление 0,084 М раствора натрия фосфорнокислого двузамещенного двуводного ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$). В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 11,87 г натрия фосфорнокислого двузамещенного двуводного, растворяют в воде очищенной, перемешивают, доводят объем раствора водой до метки и вновь перемешивают.

В мерную колбу вместимостью 100 мл вносят 29,6 мл 0,052 М раствора калия фосфорнокислого однозамещенного, доводят объем раствора 0,084 М раствором натрия фосфорнокислого двузамещенного двуводного до метки и перемешивают.

Приготовление агарового геля. К 1 л фосфатного буферного раствора добавляют 15 г агара микробиологического, автоклавируют при температуре (115±2) ºС в течение 15 мин и в горячем состоянии осветляют центрифугированием при 1000 g в течение 5 мин. Осветленный центрифугированием агар разливают слоем толщиной 6,0 мм в чашки Петри, помещенные на горизонтальную поверхность. После застывания агарового геля чашки Петри помещают в эксикатор, на дно которого наливают 100 мл воды очищенной и хранят при температуре от 2 до 8 ºС не более 5 сут.

Определение активности препарата в РДП с сибиреязвенным ЦПА.

В слое агара специальным штампом-пробойником вырезают одну центральную и шесть радиальных лунок, расстояние между центрами которых, составляет 10 мм. Остатки агара из лунок удаляют с помощью вакуума. Готовят разведения испытываемого иммуноглобулина противосибиреязвенного лошадиного 1:20, 1:40, 1:60, 1:80 до 1:100 и вносят в периферические лунки при помощи пипетки с тонким капилляром по 0,04 мл, начиная с разведения 1:100, в центральную лунку вносят сибиреязвенный ЦПА. В качестве контроля в шестую радиальную лунку вносят сыворотку лошадиную нормальную.

Чашки Петри выдерживают в эксикаторе, на дно которого наливают 100 мл очищенной воды, при температуре (20±2) ºС в течение 48 ч.

Учет реакции проводят при косом освещении на темном фоне. Реакцию оценивают, как положительную при наличии четко выраженных линий преципитации между лунками с иммуноглобулином и сибиреязвенным ЦПА. Максимальное разведение иммуноглобулина, дающее видимую линию преципитации, считают его титром. С контрольным образцом (нормальной лошадиной сывороткой и сибиреязвенным ЦПА) линии преципитации должны отсутствовать.

2. Определение превентивных свойств на морских свинках.

Шести морским свинкам массой (275±25) г вводят подкожно в область внутренней поверхности бедра шприцем вместимостью 5,0 мл иммуноглобулин противосибиреязвенный лошадиный в объеме 2,0 мл. Через (23±1) ч иммунизированных животных, а также 3 контрольных неиммунизированных морских свинок, инфицируют подкожно дозой 50 LD_{50} тест-штамма *B. anthracis* 71/12 в 1,0 мл. За животными наблюдают в течение 10 суток. Контрольные животные должны погибнуть в течение 96 ч.

Для определения величины LD_{50} тест-штамма *B. anthracis* 71/12 для морских свинок берут животных обоего пола массой (275±25) г разделяют на пять групп, из расчета не менее четырех животных в каждой. Исходя из общей концентрации спор, определяемой по счету в камере Горяева, культуру тест-штамма *B. anthracis* 71/12 разводят стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида до концентраций 200000, 40000, 8000, 1600, 320 живых спор в 1,0 мл. Животным каждой группы под кожу внутренней поверхности правого бедра шприцем вместимостью 1,0 мл вводят по 0,5 мл соответствующего разведения тест-штамма.

Наблюдение за животными ведут в течение 10 сут. Павших морских свинок вскрывают в асептических условиях и делают мазки-отпечатки кусочков тканей легкого, сердца, печени и селезенки на 2,0 % агар Хоттингера pH 7,2±0,1 в чашках Петри. Чашки помещают в термостат при температуре (36±1) ºС и выдерживают в течение 48 ч.

Специфичность гибели животных подтверждают морфологией колоний штамма *B. anthracis* на агаре Хоттингера и при микроскопии мазков-отпечатков из органов животных, окрашенных по Граму. Тест-штамм *B. anthracis* 71/12 на чашках с агаром Хоттингера должен давать рост шероховатых матовых колоний в R- и реже в RO-формах, в мазках-отпечатках должны наблюдаться грамположительные палочки длиной 3-10 мкм, шириной 1,0-1,5 мкм, расположенные длинными цепочками.

Величину LD_{50} вычисляют по формуле:

$$\lg LD_{50} = \lg D_N - \sigma (\Sigma L_i - 0,5),$$

где: D_N – максимальная из испытываемых величина дозы;

σ – логарифм отношения каждой последующей дозы к предыдущей (логарифм кратности разведения испытытываемых доз);

L_i – отношение числа животных, погибших от введения дозы, к общему числу животных, которым эта доза была введена;

$_i$ – индекс соответствует номеру дозы, если считать наименьшую из испытываемых доз первой;

ΣL_i – сумма значений L_i, найденных для всех испытанных доз.

Растворители и реагенты, выпускаемые в комплекте с препаратом

Иммуноглобулин противосибиреязвенный лошадиный, разведенный 0,9 % раствором натрия хлорида в соотношении 1:100.

Иммуноглобулин противосибиреязвенный лошадиный в разведении 1:100 предназначен для выявления индивидуальной чувствительности организма человека к лошадиному белку методом внутрикожной пробы.

Описание. Прозрачная бесцветная жидкость. Определение проводят визуально.

Прозрачность. Испытуемый раствор не должен отличаться по своей прозрачности от растворителя, используемого при его приготовлении. Определение проводят визуальным методом в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Цветность. Бесцветный или светло - желтый раствор, не превышающий степень окраски эталона Y_7. Определение проводят визуальным методом в соответствии с ОФС « Степень окраски жидкостей».

pH. От 7,0 до 7,4. Определяют потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Белок. От 0,08 до 0,10 %. Определение проводят колориметрическим методом с биуретовым реактивом в соответствии с ОФС «Количественное определение белка колориметрическим методом с биуретовым реактивом в препаратах крови человека и животных» Метод Б.

Стерильность. Должен быть стерильным. Испытание на отсутствие бактерий и грибов проводят методом прямого посева или мембранной фильтрации с использованием тиогликолевой среды в соответствии с ОФС «Стерильность».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные препараты из плазмы крови человека».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С в соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств» и ОФС «Хранение лекарственных средств». Замораживание не допускается.

Красавки листьев настойка **ФС.2.4.0003.18**

Belladonnae folii tinctura **Взамен ГФ X, ст. 686**

Красавки листьев настойка, получаемая из листьев красавки белладонны – *Atropa belladonna* L., сем. пасленовых – *Solanaceae,* применяемая для производства лекарственных препаратов.

Для получения настойки используют:

красавки листьев - 100 г;

этанола (спирта этилового) 40 % - достаточное количество для получения 1000 мл.

Описание. Прозрачная жидкость желтовато-коричневого, зеленовато-коричневого или красновато-коричневого цвета с характерным запахом.

Подлинность.

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) атропина сульфата.0,01 г СО атропина сульфата растворяют в 10 мл спирта 70 % и перемешивают. Срок годности раствора 1 мес.

Тонкослойная хроматография

10 мл настойки выпаривают с помощью роторного испарителя досуха, сухой остаток растворяют в 1 мл воды при перемешивании. К полученному раствору прибавляют 0,2 мл аммиака раствора концентрированного 25 %, 5 мл хлороформа и взбалтывают в течение 3 мин, затем добавляют 2 г натрия сульфата безводного, снова взбалтывают в течение 3 мин и фильтруют через вату (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят в виде полосы длиной 20 мм и шириной не более 2

мм 100 мкл (0,1 мл) испытуемого раствора (приготовленного для количественного определения), рядом наносят по 30 мкл (0,03 мл) раствора СО атропина сульфата (приготовленного для количественного определения). Пластинку с нанесенными пробами помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 1 ч смесью растворителей метанол – хлороформ - аммиака раствор концентрированный 25 % (20:10:1), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, обрабатывают реактивом Драгендорфа, просматривают при дневном свете и фиксируют результаты разделения в течение не более 10 мин.

На хроматограмме раствора СО атропина сульфата должна обнаруживаться зона адсорбции красно-оранжевого цвета на желтом фоне.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться доминирующая зона адсорбции красно-оранжевого цвета на уровне зоны адсорбции СО атропина сульфата; допускается обнаружение других зон адсорбции красно-оранжевого цвета.

Качественная реакция

5 мл настойки выпаривают на водяной бане до 1 мл, переносят с помощью 3 мл воды очищенной в делительную воронку вместимостью 50 мл, прибавляют 0,5 мл аммиака раствора 10 %, 15 мл хлороформа и взбалтывают в течение 3 мин. Затем добавляют 2 г натрия сульфата безводного и снова взбалтывают в течение 3 мин. Хлороформное извлечение фильтруют через бумажный фильтр с 2 алюминия окиси безводной в фарфоровую чашку. Фильтр промывают 5 мл хлороформа. Хлороформ выпаривают на водяной бане, к остатку добавляют 1 мл азотной кислоты концентрированной и выпаривают на водяной бане досуха. Сухой остаток охлаждают и смачивают 1 мл ацетона и 4 каплями калия гидроксида 0,5 М раствора спиртового; должно наблюдаться быстро исчезающее фиолетовое окрашивание (алкалоиды).

Спирт этиловый. Не менее 35 %. В соответствии с требованиями ОФС

«Определение спирта этилового в лекарственных средствах».

***Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» (контролируется в течение технологического процесса).

Сухой остаток. Не менее 0,5 %. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки».

Тяжелые металлы. Не более 0,001 %. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки».

«**Объем содержимого упаковки**». В соответствии с требованиями ОФС «Настойки».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание суммы алкалоидов в пересчете на гиосциамин должно быть от 0,027 до 0,033 %.

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) атропина сульфата. Около 0,1160 г (точная навеска) СО атропина сульфата растворяют в 5 мл воды и переносят в делительную воронку. Бюкс, в котором взвешивали навеску атропина сульфата, дважды промывают по 2,5 мл воды и переносят в делительную воронку, прибавляют 0,5 мл аммиака раствора концентрированного 25 % и извлекают последовательно 20 мл; 15 мл; 15 мл хлороформа в течение 3 мин. Хлороформные извлечения фильтруют через фильтр с 2 г натрия сульфата безводного, смоченного 5 мл хлороформа, в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора хлороформом до метки и перемешивают (раствор А).

Срок годности раствора 6 месяцев.

10 мл полученного раствора А переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора хлороформом до метки и перемешивают (раствор Б). 1 мл раствора содержит 0,0001 г атропина основания.

Срок годности раствора 1 месяц.

3 мл раствора Б стандартного образца атропина помещают в делительную воронку, прибавляют 12 мл хлороформа, 2 мл 0,1 % раствора метиленового оранжевого, 2 мл фосфатного буферного раствора pH 6,0 (2) и далее проводят определение аналогично определению испытуемого раствора.

Смесь спирт 95 % - серная кислота концентрированная (50 : 1). К 50 мл спирта 95 % осторожно прибавляют 1 мл серной кислоты концентрированной.

Срок годности раствора 1 год.

К 2,0 мл настойки прибавляют 8 мл спирта 95 % и фильтруют через бумажный фильтр, смоченный спиртом 95 %, в коническую колбу. 5,0 мл полученного фильтрата помещают в фарфоровую чашку и выпаривают на водяной бане досуха. Сухой остаток количественно переносят 10 мл воды (частями по 2,5 мл), фильтруя через бумажный фильтр, смоченный водой, в делительную воронку. Фарфоровую чашку и осадок на фильтре промывают дважды по 2,5 мл воды. Водный раствор в делительной воронке подщелачивают 0,5 мл аммиака раствора 10 % и взбалтывают с 25 мл хлороформа в течение 15 мин.

Хлороформное извлечение фильтруют через бумажный фильтр с 3 г натрия сульфата безводного, смоченного 5 мл хлороформа, в фарфоровую чашку. Водный раствор в делительной воронке взбалтывают еще дважды с 10 мл хлороформа в течение 5 мин. Объединенные хлороформные извлечения выпаривают на водяной бане приблизительно до 2 мл, остаток растворителя удаляют продуванием воздуха.

Остаток из фарфоровой чашки количественно переносят 15 мл хлороформа в делительную воронку, прибавляют 2 мл раствора метилового оранжевого спиртового раствора 0,1 %, добавляют 2 мл буферного раствора с pH 6,0 и взбалтывают в течение 2 мин. После расслаивания хлороформное извлечение фильтруют через бумажный фильтр, содержащий 2 г натрия сульфата безводного, смоченного хлороформом, в мерную колбу вместимостью 50 мл. Операцию извлечения повторяют еще дважды с 10 мл хлороформа, собирая хлороформные извлечения в ту же мерную колбу. К хлороформным извлечениям прибавляют 5 мл смеси спирт 95 % - кислота серная концентрированная (50 : 1), доводят объем раствора спиртом 95 % до метки и перемешивают (испытуемый раствор).

Измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 521 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения. В качестве раствора сравнения используют хло-

роформ.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора стандартного образца атропина сульфата.

Содержание суммы алкалоидов в пересчете на гиосциамин в настойке в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_o \cdot 10 \cdot 3 \cdot 10 \cdot 50 \cdot 100}{A_o \cdot 100 \cdot 100 \cdot 50 \cdot 2 \cdot 5 \cdot 1{,}169} =$$

$$= \frac{A \cdot a_o \cdot 0{,}3}{A_o \cdot 1{,}169}$$

где

A - оптическая плотность испытуемого раствора;

A_o - оптическая плотность раствора СО атропина сульфата;

a - объем настойки, взятый для определения, мл;

a_o – навеска стандартного образца атропина сульфата, г;

k- коэффициент пересчёта атропина сульфата на гиосциамин основание, равный 1,169.

Хранение. В защищенном от света месте при температуре от 8 до 15 °С.

Красавки листьев экстракт густой **ФС.2.4.0004.18**

Belladonnae folii extractum spissum **Взамен ГФ X, ст. 255**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Красавки экстракт густой, получаемый из листьев или травы красавки белладонны – *Atropa belladonna* L. сем. пасленовых – *Solanaceae* экстракцией спиртом 20 % при соотношении сырье : экстракт густой (4 : 1), применяемый для производства лекарственных препаратов.

Описание. Густая масса темно-коричневого цвета характерного запаха.

Подлинность.

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) атропина сульфата. 0,01 г СО атропина сульфата растворяют в 10 мл спирта 70 % и перемешивают. Срок годности раствора 1 мес.

Тонкослойная хроматография

В колбу с притертой пробкой вместимостью 25 мл помещают 0,2 г экстракта и растворяют в 0,5 мл воды при перемешивании. К полученному раствору прибавляют 0,1 мл аммиака раствора концентрированного 25 %, 5 мл хлороформа и взбалтывают в течение 3 мин, затем добавляют 2 г натрия сульфата безводного и снова взбалтывают в течение 3 мин. Хлороформное извлечение фильтруют через вату (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят в виде полосы длиной 20 мм и шириной не более 2 мм 100 мкл (0,1 мл) испытуемого раствора, рядом наносят 50 мкл (0,05 мл) раствора СО атропина сульфата. Пластинку с нанесенными пробами сушат

при комнатной температуре, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 1 ч смесью растворителей метанол – хлороформ - аммиака раствор концентрированный 25 % (20:10:1), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, обрабатывают реактивом Драгендорфа, просматривают при дневном свете и фиксируют результаты разделения в течение не более 10 мин.

На хроматограмме раствора СО атропина сульфата должна обнаруживаться зона адсорбции красновато-оранжевого цвета на желтом фоне.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться доминирующая зона адсорбции красновато-оранжевого цвета на уровне зоны адсорбции СО атропина сульфата, допускается обнаружение других зон адсорбции красно-оранжевого цвета.

Качественные реакции

1. К 0,02 г экстракта прибавляют 5 мл хлороформа, 2 капли воды, 1 каплю аммиака раствора концентрированного 25 % и взбалтывают; в УФ - свете (365 нм) должна наблюдаться флуоресценция голубого цвета (отличие от белены экстракта).

2. 0,1 г экстракта помещают в делительную воронку, приливают 5 мл воды, добавляют 0,5 мл аммиака раствора 25 %, 10 мл хлороформа и взбалтывают в течение 3 мин. Хлороформное извлечение фильтруют через бумажный фильтр с 2 г натрия сульфата безводного в фарфоровую чашку. Хлороформ выпаривают на водяной бане досуха. К сухому остатку прибавляют 1 мл азотной кислоты концентрированной и выпаривают на водяной бане досуха. После охлаждения к сухому остатку прибавляют 1 мл ацетона и 4 каплями 0,5 М раствора калия гидроксида спиртового; должно наблюдаться быстро исчезающее фиолетовое окрашивание (алкалоиды группы тропана).

Потеря в массе при высушивании. Не менее 25 %. В соответствии с требованиями ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Тяжелые металлы. Не более 0,01 %. В соответствии с требованиями ОФС «Экстракты».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание суммы алкалоидов в пересчете на гиосциамин должно быть от 1,4 до 1,6 %.

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) атропина сульфата. Около 0,1160 г (точная навеска) СО атропина сульфата, предварительно высушенного при температуре 135 °С до постоянной массы, количественно переносят 10 мл воды в делительную воронку, прибавляют 0,5 мл аммиака концентрированного раствора и извлекают последовательно 20 мл; 15 мл; 15 мл хлороформа при взбалтывании в течение 3 мин. Хлороформные извлечения фильтруют через фильтр с 2 г натрия сульфата безводного, смоченного 5 мл хлороформа, в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора хлороформом до метки и перемешивают (раствор А).

Срок годности раствора 6 месяцев.

10 мл полученного раствора А переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора хлороформом до метки и перемешивают (раствор Б). 1 мл раствора содержит 0,0001 г атропина основания.

Срок годности раствора 1 месяц.

3 мл раствора Б стандартного образца атропина помещают в делительную воронку, прибавляют 7 мл хлороформа, 0,5 мл раствора бромтимолового синего, 10 мл 0,2 М фосфатного буферного раствора с pH 7,5 и далее проводят определение аналогично определению испытуемого раствора.

Раствор бромтимолового синего. 0,15 г бромтимолового синего и 0,15 г натрия карбоната безводного растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 100 мл при нагревании. После охлаждения объем раствора доводят водой до метки и перемешивают.

Срок годности раствора 1 месяц.

Раствор борной кислоты. 0,5 г борной кислоты растворяют в смеси 25 мл спирта 95 % и 20 мл воды при нагревании в мерной колбе вместимостью 250 мл, охлаждают, доводят объем раствора спиртом 95 % до метки и перемешивают.

Срок годности раствора 6 месяцев.

Около 0,5 г (точная навеска) экстракта помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 10 мл 0,2 М фосфатного буферного раствора С pH 7,5, доводят объем раствора тем же растворителем до метки, перемешивают и дают отстояться.

2,0 мл полученного раствора помещают в делительную воронку, прибавляют 8 мл 0,2 М фосфатного буферного раствора с pH 7,5, добавляют 0,5 мл раствора бромтимолового синего, 10 мл хлороформа и взбалтывают в течение 3 мин. Хлороформное извлечение фильтруют через бумажный фильтр с 10 г натрия сульфата безводного, смоченного хлороформом, в мерную колбу вместимостью 50 мл. Фильтр промывают 3 мл хлороформа. Извлечение повторяют еще 2 раза по 10 мл хлороформа. Полученные извлечения фильтруют через тот же фильтр в ту же мерную колбу. В ту же мерную колбу прибавляют 10 мл борной кислоты раствора, доводят объем раствора спиртом 95 % до метки и перемешивают (испытуемый раствор).

Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 420 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения. В качестве раствора сравнения используют хлороформ.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора стандартного образца атропина сульфата.

Содержание суммы алкалоидов в пересчете на гиосциамин в экстракте в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 50 \cdot a_o \cdot 10 \cdot (289{,}38 \cdot 2) \cdot 3 \cdot 100}{A_o \cdot a \cdot 2 \cdot (694{,}8 - 18{,}02) \cdot 100 \cdot 100 \cdot 50} =$$

$$= \frac{A \cdot a_o \cdot 6{,}41}{A_o \cdot a}$$

где

A - оптическая плотность испытуемого раствора;

A_o - оптическая плотность раствора СО атропина сульфата;

a - навеска экстракта, г;

a_o – навеска СО атропина сульфата, г;

289,38 – молекулярная масса атропина основания, г;

694,8 – молекулярная масса атропина сульфата, г;

18,02 – молекулярная масса воды, г.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Экстракты».

Крушины ольховидной коры экстракт сухой
Rhamni frangulae corticis extractum siccum

ФС.2.4.0005.18

Взамен ГФ X ст. 259

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Крушины экстракт сухой, получаемый из собранной весной до начала цветения и выдержанный не менее 1 года в сухом месте или подвергавшийся нагреванию при 100 °С в течение 1 ч коры стволов и ветвей дикорастущего кустарника или небольшого деревца крушины ольховидной (син.: крушина ломкая) – *Frangula alnus Mill.* (syn.: *Rhamnus frangula* L.), сем. крушиновых – *Rhamnaceae*, экстракцией спиртом 70 % при соотношении сырья и конечного продукта – (1,1-1,3) : 1, применяемый для производства нестерильных лекарственных средств.

Описание

Порошок от коричневого с зеленоватым оттенком до темно-коричневого цвета с характерным запахом. Гигроскопичен, комкуется.

Подлинность

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов

Раствор стандартного образца (СО) эмодина. Около 0,01 г СО эмодина растворяют в 25 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора 1 мес.

Раствор натрия гидроксида водно-спиртовый 2 %. 0,5 г натрия гидроксида помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 5 мл воды, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают.

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором, предварительно

выдержанной в течение 1 ч при температуре 100-105 °С, наносят в виде полос длиной 10 мм и шириной не более 2 мм по 10 мкл (0,01 мл) раствора А (см. раздел «Количественное определение») и раствора СО эмодина. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе и помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 1 ч смесью растворителей этилацетат – спирт 96 % – вода (7:2:1), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, пластинку вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО эмодина должна обнаруживаться зона адсорбции желтого цвета.

На хроматограмме раствора А должна обнаруживаться зона адсорбции от светло-желтого до желтого с оранжевым оттенком цвета на уровне зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО эмодина.

Затем хроматограмму обрабатывают раствором натрия гидроксида водно-спиртовым 2 % и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО эмодина должна обнаруживаться зона адсорбции розово-красного цвета.

На хроматограмме раствора А должна обнаруживаться зона адсорбции от светло-розового до розово-красного цвета на уровне зоны адсорбции СО эмодина (франгулоэмодин); допускается обнаружение зоны адсорбции на линии старта.

Качественные реакции

1. К 1 г экстракта прибавляют 1 мл спирта 96 % и 10 мл воды, перемешивают, нагревают на водяной бане в течение 1 мин, затем охлаждают и фильтруют через бумажный фильтр. Фильтрат взбалтывают в делительной воронке с 10 мл эфира и отстаивают; эфирный слой должен окрашиваться в интенсивно-желтый цвет (хризофановая кислота).

2. 5 мл эфирного извлечения переносят в другую делительную воронку, прибавляют 5 мл аммиака водного и взбалтывают; водно-аммиачный слой должен окрашиваться в интенсивно-красный цвет (оксиметилантрахиноны).

Потеря в массе при высушивании. Не более 5,0 %. В соответствии с требованиями ОФС «Потеря в массе при высушивании**».**

Тяжелые металлы. Не более 0,01 %. В соответствии с требованиями ОФС «Экстракты».

Остаточные органические растворители. Не более 0,5 %. В соответствии с требованиями ОФС «Остаточные органические растворители».

Остаточное количество этанола в экстракта определяют методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ).

Приготовление растворов

Стандартный раствор. 1,00 г этанола или 1,04 г спирта 96 % помещают в мерную колбу вместимостью 200 мл, доводят объем до метки водой и перемешивают (раствор А).

1,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (раствор Б).

Проверка пригодности хроматографической системы.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются условия:

- относительное стандартное отклонение площадей пика этанола для трех повторных введений стандартного раствора должно быть не более 5 %;
- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику этанола на хроматограмме стандартного раствора, должна быть не менее 1000 теоретических тарелок;
- фактор асимметрии пика этанола должен быть не более 2.

Около 1 г (точная навеска) экстракта помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 25 мл, прибавляют 10,0 мл воды, закрывают пробкой и перемешивают в течение 10 мин при периодическом

нагревании на водяной бане при температуре не более 40 °С. Затем смесь охлаждают, переносят в центрифужную пробирку, закрывают парафинированной пленкой и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 30 мин, после чего отбирают пипеткой около 2 мл надосадочной жидкости (испытуемый раствор).

По 1,0 мкл испытуемого раствора и стандартного раствора Б последовательно хроматографируют на газовом хроматографе с программным управлением и обработкой данных, получая для каждого раствора не менее 5 хроматограмм в следующих условиях:

- детектор пламенно-ионизационный;
- колонка капиллярная с фазой OV-624 длиной 30 м, с внутренним диаметром 0,53 мм или аналогичная при условии соблюдения требований теста «Проверка пригодности хроматографической системы»;
- температура колонки – 45 °С;
- температура детектора – 150 °С;
- температура инжектора – 200 °С;
- газ-носитель – гелий;
- скорость потока газа-носителя – 30 см/сек;
- расход водорода – 30 мл/мин;
- расход воздуха – 300 мл/мин.

Идентификацию этанола осуществляют путем сравнения времени удерживания пика на хроматограмме испытуемого раствора и пика этанола на хроматограмме стандартного раствора.

Содержание остаточного растворителя – этанола в экстракте (*X*) в процентах рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot a_0 \cdot 10 \cdot 1 \cdot 100}{S_0 \cdot a_1 \cdot 200 \cdot 10} = \frac{S_1 \cdot a_0}{S_0 \cdot a_1 \cdot 2},$$

где S_0 - среднее значение площадей пиков определяемого компонента на хроматограммах стандартного раствора;

S_1 - среднее значение площадей пиков определяемого компонента на хроматограммах испытуемого раствора

a_0 - навеска этанола или спирта 96 %, г;

a_1- навеска экстракта, г.

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание суммы антраценпроизводных в пересчете на франгулаэмодин и сухое вещество в экстракта должно быть не менее 2,0 %.

Около 0,5 г (точная навеска) экстракта помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 % и нагревают при периодическом перемешивании на водяной бане с обратным холодильником в течение 1 ч. Не прекращая нагревание, в колбу через холодильник осторожно прибавляют 20 мл хлороформа и нагревают в течение 10 мин. Затем колбу, не снимая холодильник, вынимают из водяной бани и охлаждают до комнатной температуры. Содержимое колбы количественно переносят 5 мл хлороформа в делительную воронку вместимостью 250 мл. После разделения слоев, хлороформную фазу сливают в сухую коническую колбу, водяную фазу экстрагируют хлороформом еще 3 раза порциями по 15 мл, каждый раз перемешивая в течение 2 мин. Хлороформные извлечения объединяют, затем фильтруют через бумажный фильтр с 2 г натрия сульфата безводного, предварительно смоченного хлороформом, колбу и фильтр ополаскивают 3 мл хлороформа, который присоединяют к основному фильтрату.

Фильтрат упаривают на роторном испарителе при температуре водяной бани 60-65 °С, остаток смешивают с 5 мл спирта 96 % и наносят на колонку с полиамидом. Колбу ополаскивают 10 мл спирта 96 %, который также наносят на колонку.

Элюат собирают в мерную колбу вместимостью 50 мл, элюирование проводят спиртом 96 % порциями по 2 мл до достижения номинального объема мерной колбы. Затем содержимое мерной колбы тщательно перемешивают (раствор А).

1 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 10 мл щелочно-аммиачного раствора, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б).

Измеряют оптическую плотность раствора Б на спектрофотометре при длине волны 530 нм, в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения. В качестве раствора сравнения используют спирт 96 %.

Содержание суммы антраценпроизводных в пересчете на франгулаэмодин и сухое вещество в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 25 \cdot 50 \cdot 100 \cdot 100}{A_{1см}^{1\%} \cdot a \cdot 100 \cdot 1 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 12500}{29 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б;

a – навеска экстракта, г;

$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения франгулаэмодина при длине волны 530 нм, равный 290;

W – потеря в массе при высушивании, %.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Экстракты».

Мяты перечной листьев масло эфирное	**ФС2.4.0001.18**
Menthae piperitae foliorum oleum aethereum	**Взамен ГФ X, ст. 477**

Эфирное масло, получаемое из свежих листьев и надземных частей цветущего растения мяты перечной – Mentha piperita L., сем. губоцветных – *Labiatae*, применяемое для производства лекарственных препаратов.

Описание. Легко подвижная прозрачная жидкость от бесцветного до светло-желтого или зеленовато-желтого цвета, с характерным запахом.

Растворимость. Легко растворима в спирте 96 %; 1 объемная часть субстанции должна растворяться в 4 мл спирта 70 % с образованием прозрачного раствора.

Подлинность. Испытание проводят методом газовой хроматографии одновременно с количественным определением.

На хроматограмме испытуемого раствора должны регистрироваться не менее 9 пиков с временами удерживания, совпадающими с временами удерживания пиков на хроматограмме стандартного раствора.

Плотность. От 0,896 до 0,916 в соответствии с требованиями ОФС «Плотность».

Угол вращения. От -10° до -30° в соответствии с требованиями ОФС «Поляриметрия».

Показатель преломления. От 1,457 до 1,470 в соответствии с требованиями ОФС «Рефрактометрия».

***Спирт**. В соответствии с ОФС «Эфирные масла».

Жирные и минеральные масла. Должны отсутствовать в соответствии с ОФС «Эфирные масла».

****Вода**. В соответствии с ОФС «Эфирные масла».

Кислотное число. Не более 1,40 в соответствии с требованиями ОФС

«Кислотное число».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота» (категория 3.2).

Количественное определение. Испытание проводят методом газовой хроматографии с использованием метода процентной нормализации для расчета.

Приготовление растворов

Раствор сравнения. 25 мкл лимонена, 50 мкл 1,8-цинеола, 100 мкл ментона, 25 мкл ментофурана, 25 мкл изо-ментона, 100 мкл ментилацетата, 150 мг левометола, 50 мкл пулегона и 25 мкл карвона помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в спирте 95 %, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Срок годности раствора 7 суток при хранении при температуре 2 – 8 °С.

Испытуемый раствор. Около 0,5 г (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в небольшом количестве спирта 95 %, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Проверка пригодности хроматографической системы.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику ментола, должна быть не менее 1 000 теоретических тарелок;
- разрешение между пиками должно быть не менее 1,0.

Условия хроматографирования:

- колонка капиллярная 60 м × 0,32 мм, жидкая фаза 100 % полиэтиленгликоль (толщина пленки 25 мкм);
- детектор пламенно-ионизационный;
- газ-носитель: азот;
- скорость газа-носителя 20 см /сек;
- деление потока 1:7;
- температура термостата колонки: начальная температура 150 °С в течение 6 мин; скорость подъема температуры 5 °С/мин до 170 °С; выдержка при конечной температуре 170 °С в течение 10 мин;
- температура испарителя 250 °С;

- температура детектора 250 °С;
- объем вводимых растворов – 1 мкл;
- время регистрации хроматограммы 20 мин.

Хроматографируют попеременно по 1 мкл испытуемого и стандартного растворов, получая не менее 3 хроматограмм в указанных выше условиях. Порядок выхода компонентов – аналогично описанию приготовления Раствора сравнения.

На хроматограмме испытуемого раствора идентифицируют пики компонентов с теми же временами удерживания, что и на хроматограмме раствора сравнения.

Содержание каждого компонента (лимонена, 1,8 - цинеола, ментона, ментофурана, изо-ментона, ментилацетата, ментола, пулегона, карвона) в процентах (X, %) вычисляют по формуле:

$$\tilde{O}_i = \frac{S_i \times 100}{\sum S_i}$$

где

Si – площадь определяемого пика каждого из компонентов на хроматограмме испытуемого раствора;

ΣS_i – сумма площадей всех пиков на хроматограмме испытуемого раствора;

Процентное содержание компонентов должно быть в следующих пределах:

лимонена – от 1,0 % до 5,0 %;

1,8-цинеола – от 3,5 % до 14,0 %;

ментона – от 14,0 % до 32,0 %;

ментофурана - от 1,0 % до 9,0 %;

изо-ментона – от 1,5 % до 10,0 %;

ментилацетат – от 2,8 % до 10,0 %;

ментола – не менее 40 %;

пулегона – не более 4,0 %;

карвона – не более 1,0 %.

Хранение. В защищенном от света месте при температуре от 2 до 25 °С.

Примечание. Показатели, обозначенные «*» и «**», включаются в зависимости от технологии получения.

Допускается использование для производства лекарственных препаратов масла мятного с содержанием ментола от 30 %

Эвкалипта листьев масло эфирное **ФС.2.4.0002.18**

Eucalypti foliorum oleum aethereum **Взамен ГФ X ст. 475**

Эфирное масло, получаемое из свежих листьев или свежих верхушечных побегов Эвкалипта шарикового - *Eucalyptus globulus Labill*. и других богатых 1,8-цинеолом видов Эвкалипта, сем. миртовых – *Myrtaceae*, применяемое для производства лекарственных препаратов.

Описание. Легко подвижная прозрачная жидкость от бесцветного до светло-желтого цвета, с характерным запахом.

Растворимость. Легко растворима в спирте 96 %; 1 объемная часть субстанции должна растворяться в не более 5 мл спирта 70 %.

Подлинность.

Приготовление растворов.

Приготовление раствора стандартного образца (СО) 1,8 - цинеола. 50 мкл СО 1,8 - цинеола растворяют в 10 мл толуола. Раствор используют свежеприготовленным.

Приготовление испытуемого раствора. 0,1 г субстанции растворяют в 10 мл толуола. Раствор используют свежеприготовленным.

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят полосами длиной 10 мм и шириной не более 2 мм по 10 мкл (0,01 мл) испытуемого раствора и раствора СО 1,8 – цинеола. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, содержащую смесь растворителей этилацетат – толуол (10 : 90), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, опрыскивают анисового альдегида раствором уксуснокислым в метаноле, выдерживают при 100 – 105 °С в течение 5 -

10 мин и просматривают в дневном свете.

На хроматограмме раствора СО 1,8 – цинеола должна обнаруживаться зона адсорбции фиолетово-коричневого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции фиолетово-коричневого цвета на уровне зоны адсорбции СО 1,8 – цинеола; допускается обнаружение других зон адсорбции.

Плотность. От 0,905 до 0,930. В соответствии с требованиями ОФС «Плотность».

Угол вращения. От 0° до + 10°. В соответствии с требованиями ОФС «Поляриметрия».

Показатель преломления. От 1,458 до 1,470. В соответствии с требованиями ОФС «Рефрактометрия».

***Спирт этиловый**. В соответствии с ОФС «Эфирные масла».

****Вода**. В соответствии с ОФС «Эфирные масла».

Альдегиды. 10 мл субстанции помещают в пробирку вместимостью 25 мл с притертой пробкой, прибавляют 5 мл толуола, 4 мл гидроксиламина гидрохлорида раствора спиртового 5 %, энергично встряхивают в течение 5 мин и оставляют до разделения слоев. Прибавляют 2 мл 0,5 М раствора калия гидроксида спиртового, снова энергично встряхивают и оставляют до разделения слоев; нижний слой должен иметь окраску от слабо желтой до желтой без розового оттенка.

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение.

Испытание проводят методом газовой хроматографии.

Приготовление растворов

Стандартный раствор. 80 мкл СО α-пинена, 5 мкл СО β-пинена, 5 мкл α-феландрена, 10 мкл СО лимонена, 5 мг СО камфоры и 0,8 мл СО 1,8 – цинеола помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в ацетоне и перемешивают.

Испытуемый раствор. Эфирное масло.

Проверка пригодности хроматографической системы.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику лимонена, должна быть не менее 30 000 теоретических тарелок;
- разрешение между пиками лимонена и 1,8-цинеола должно быть не менее 1,5.

Условия хроматографирования:

- колонка капиллярная 60 м × 0,32 мм, толщина пленки неподвижной фазы (полиэтиленгликоль 100 %) 25 мкм;
- детектор пламенно-ионизационный;
- газ-носитель: гелий для хроматографии;
- скорость газа-носителя 1,5 мл/мин;
- деление потока 1:50;
- программа градиента температуры термостата колонки: начальная температура 60 °С в течение 5 мин; скорость подъема температуры 5 °С/мин до 200 °С; выдержка при конечной температуре 200 °С в течение 5 мин;
- температура инжектора 220 °С;
- температура детектора 220 °С;
- объем вводимых растворов – 1 мкл;
- время регистрации хроматограммы 40 мин.

Хроматографируют попеременно испытуемый и стандартный растворы, получая не менее 3 хроматограмм в указанных выше условиях.

Время удерживания 1,8 – цинеола составляет около 14 мин. Порядок выхода компонентов: α-пинен, β-пинен, лимонен, 1,8 – цинеол, α-феландрен, камфора.

Расчет содержания каждого компонента осуществляют по методу внутренней нормализации.

Содержание каждого компонента (α-пинена, β-пинена, α-феландрена, лимонена, 1,8-цинеола, камфоры) в процентах (X, %) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{Si \cdot 100}{\sum Si}$$

где

Si – площадь пика каждого из определяемых компонентов на хроматограмме испытуемого раствора;

$\sum Si$ – сумма площадей всех пиков на хроматограмме испытуемого раствора.

Процентное содержание компонентов должно быть в следующих пределах:

α-пинена – от 0,05 % до 10,0 %;

β-пинена – от 0,05 % до 1,5 %;

камфоры – не более 0,1 %;

α-феландрена - от 0,05 % до 1,5 %;

лимонена – от 0,05 % до 15,0 %;

1,8-цинеола – не менее 70 %.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственных средств» и «Эфирные масла».

Примечание. Показатели, обозначенные «*» и «**», включаются в зависимости от технологии получения.

Аира обыкновенного корневища **ФС.2.5.0056.18**

Acori calami rhizomata **Взамен ГФ XI, вып. 2, ст. 72**

Собранные осенью или ранней весной, отмытые от земли, освобожденные от корней, остатков листьев и стеблей, высушенные корневища многолетнего дикорастущего травянистого растения аира обыкновенного - *Acorus calamus* L., сем. ароидных – *Araceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Куски корневищ легкие, цилиндрические, слегка сплюснутые и изогнутые, иногда разветвленные, большей частью продольно-разрезанные, не очищенные от опробковевшего слоя, на верхней стороне видны полулунные широкие рубцы от отмерших листьев, на нижней стороне - многочисленные мелкие круглые следы отрезанных корней; излом неровный, губчато-пористый. Длина кусков до 30 см, толщина до 2 см.

Цвет снаружи желтовато - коричневый или красновато - коричневый, иногда зеленовато - коричневый, рубцы от листьев темно - коричневые, на изломе цвет желтоватый или розоватый, иногда зеленоватый.

Запах сильный, характерный. Вкус водного извлечения пряно-горький.

Измельченное сырье. Кусочки корневищ различной формы, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет желтоватый, беловато-розовый или розоватый, иногда зеленоватый или серовато-зеленый с частично сохранившейся желтовато-коричневой или коричневой пробкой.

Запах сильный, характерный. Вкус водного извлечения пряно-горький.

Порошок. Смесь кусочков желтоватого или беловато-розовый или ро-

зоватый, иногда зеленоватого или зеленовато-серого, с частично сохранившейся желтовато-коричневой или коричневой пробкой, проходящая сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

Запах сильный, характерный. Вкус водного извлечения пряно-горький.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении поперечного среза корневища под микроскопом должна быть видна покровная ткань (эпидермис), состоящая из продольно вытянутых клеток с четковидным утолщением стенок, и основная ткань корневища, разделенная слоем эндодермы на кору и центральный цилиндр. Как в коре, так и в центральном цилиндре должны быть видны многочисленные проводящие пучки, состоящие из спиральных и лестничных сосудов и волокон, расположенные беспорядочно. В коре пучки коллатеральные, закрытые и окружены узкими механическими волокнами; здесь же встречаются и отдельные группы (тяжи) механических волокон с кристаллоносной обкладкой. В центральном цилиндре концентрические, центрофлоэмные, без механических волокон, проводящие пучки в основном сосредоточены вблизи эндодермы. Основная ткань корневища представляет собой аэренхиму, которая образована округлыми или овальными клетками паренхимы с хорошо заметным четковидным утолщением стенок и с очень крупными межклетниками. Клетки паренхимы заполнены мелкими (2-4 мкм) крахмальными зернами, простыми, изредка 2-х сложными; в отдельных, наиболее крупных клетках (идиобластах) содержатся капли эфирного масла желтоватого или желтовато-коричневого цвета.

Измельченное сырье. При рассмотрении «давленого» препарата» под микроскопом должны быть видны фрагменты эпидермиса, состоящего из продольно вытянутых клеток с четковидным утолщением стенок, группы округлых паренхимных клеток аэренхимы, нередко с хорошо заметным четковидным утолщением стенок, среди паренхимных клеток – крупные клетки – идиобласты с оранжево-розовым или оранжево-красным эфирным маслом (гистохимическая реакция с раствором Судана III), встречаются клетки – идиобласты с коричневым содержимым (дубильные вещества), группы воло-

кон с кристаллоносной обкладкой, фрагменты сосудисто-волокнистых пучков, состоящих из спиральных и лестничных сосудов и волокон.

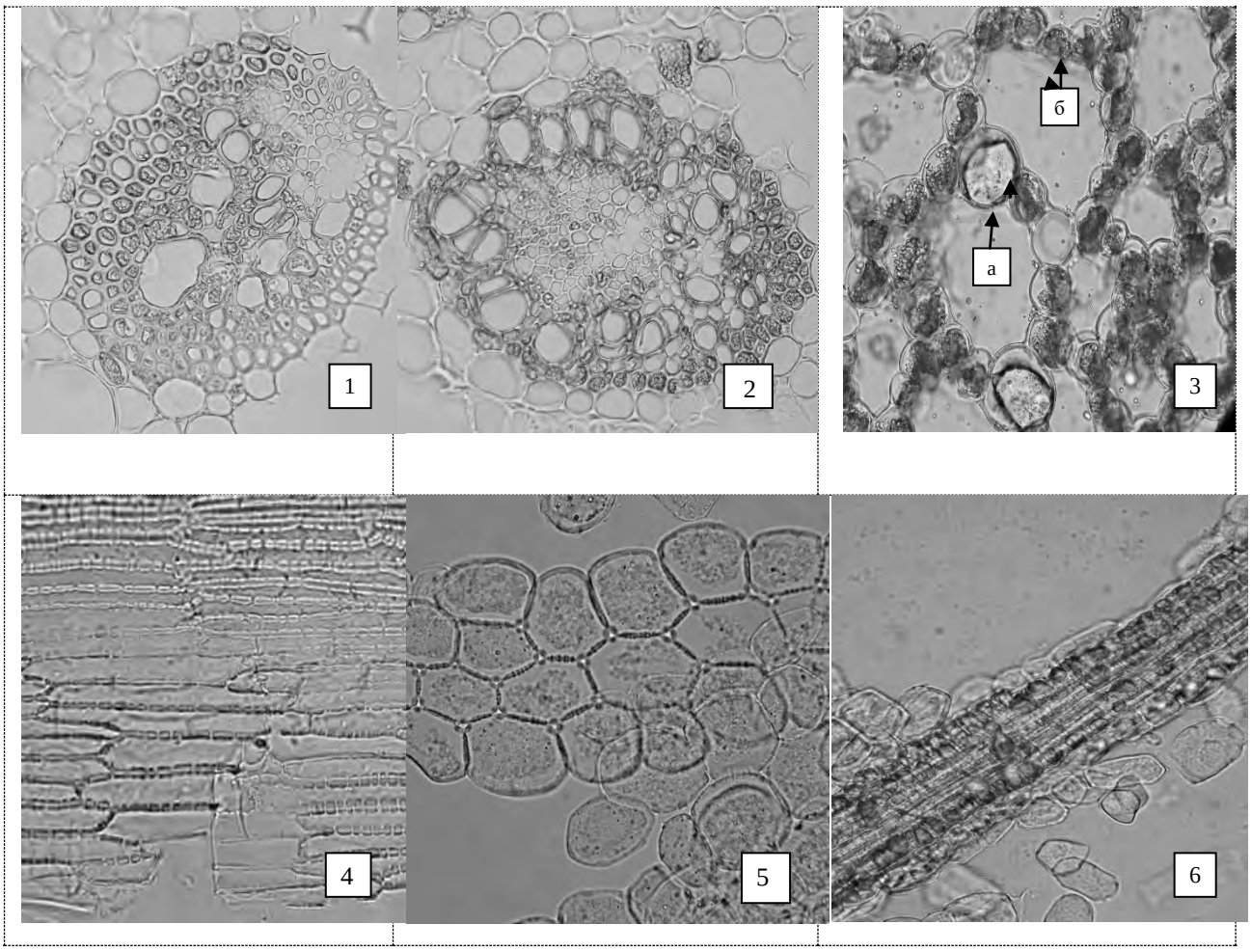


Рис. Аира обыкновенного корневища

1 – коллатеральный проводящий пучок со склеренхимной обкладкой (200×), 2 – центрофлоэмный проводящий пучок (200×), 3 – фрагмент аэренхимы с крупными клетками идиобластами, содержащие эфирное масло (a), и паренхимными клетками с крахмальными зернами (b) (200×), 4 – клетки эпидермиса с четковидным утолщением стенок («давленый препарат») (200×), 5 – группа паренхимных клеток с четковидным утолщением стенок (200×), 6 – волокна с кристаллоносной обкладкой («давленый препарат») (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор СО ментола. Около 0,01 г СО ментола (левоментола) растворяют в 10 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор стандартного образца (СО) судана красного G. Около 0,0025 г СО судана красного G растворяют в 10 мл спирта 96 %. Срок годности раствора 6 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Анисового альдегида раствор спиртовой сернокислый (2). Смешивают последовательно: 0,5 мл анисового альдегида, 10 мл уксусной кислоты ледяной, 85 мл спирта 96 % и 5 мл серной кислоты концентрированной. Срок годности раствора 1 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм.

Около 1,0 г измельченного сырья помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл спирта 96 %, нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 10 мин. После охлаждения до комнатной температуры извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля в виде полос длиной 10 мм и шириной не более 3 мм наносят 10 мкл (0,01 мл) испытуемого раствора и рядом по 5 мкл (0,005 мл) раствора СО судана красного G и раствора СО ментола.

Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин смесью растворителей толуол – этилацетат (95:5), и хроматографируют восходящим способом.

Когда фронт растворителей пройдет 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры и сушат до удаления следов растворителей. Пластинку обрабатывают анисового альдегида раствором спиртовым сернокислым (2), выдерживают в сушильном шкафу при 100 – 105 ºС в течение 2 – 3 мин после чего сразу же просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО ментола и раствора СО судана красного G должны обнаруживаться зона адсорбции сине-голубого или

сине-фиолетового цвета и розово-красного или фиолетово-красного цвета соответственно.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться зоны адсорбции (в порядке возрастания): сине-фиолетового или сине-серого цвета, розово-красного или фиолетово-красного цвета, розового цвета, коричнево-серого или коричнево-фиолетового цвета (терпеноиды); допускается обнаружение других зон адсорбции.

Качественная реакция

Около 5 г сырья, измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, помещают в колбу вместимостью 250 мл, приливают 100 мл кипящей воды, кипятят на плитке в течение 5 мин, охлаждают и фильтруют через бумажный складчатый фильтр. К 3 мл фильтрата прибавляют 1 мл свинца(II) ацетата основного раствора; должно наблюдаться образование осадка светло-коричневого цвета (дубильные вещества).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье. Измельченное сырье* – не более 14 %; *порошок* – не более 10 %.

Зола общая. *Цельное сырье. Измельченное сырье. Порошок* – не более 6 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье. Измельченное сырье. Порошок* – не более 4 %.

Измельченность сырья. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; измельченных частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %.

Порошок - частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Корневищ, изменивших окраску (потемневших на изломе). *Цельное сырье. Измельченное сырье* – не более 5 %.

Других частей растения (корневищ, плохо очищенных от корней и остатков листьев). *Цельное сырье* – не более 5 %.

Органической примеси. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1 %.

Минеральной примеси. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 2 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение.

Цельное сырье: эфирного масла – не менее 2 %*, измельченное сырье, порошок:* эфирного масла – не менее 1,5 %.

Определение эфирного масла проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 3; навеска 10,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм; время перегонки – 1,5 ч).

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Алтея корни **ФС.2.5.0001.15**

Althaeaeradices

Собранные осенью или весной, тщательно очищенные от земли, высушенные боковые и неодревесневшие, очищенные от пробки стержневые корни дикорастущих и культивируемых многолетних травянистых растений алтея лекарственного – *Althaea officinalis*L. и алтея армянского – *Althaea armeniaca*Ten., сем.мальвовых – *Malvaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки*. Цельное сырье.* Корни, почти цилиндрической формы или расщепленные вдоль на 2–4 части, слегка суживающиеся к концу, длиной 10–35 см и толщиной до 2 см, очищенные от пробки. Поверхность корней продольно-бороздчатая с отслаивающимися длинными, мягкими лубяными волокнами и темными точками – следами отпавших или отрезанных тонких корней. Излом в центре зернисто-шероховатый, снаружи волокнистый. Цвет корня снаружи и в изломе белый, желтовато-белый (алтей лекарственный) или сероватый (алтей армянский). Запах слабый, характерный. Вкус водного извлечения сладковатый с ощущением слизистости.

Измельченное сырье. При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки волокнистых корней различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет белый, желтовато-белый или серовато-белый. Запах слабый,

своеобразный. Вкус водного извлечения сладковатый с ощущением слизистости.

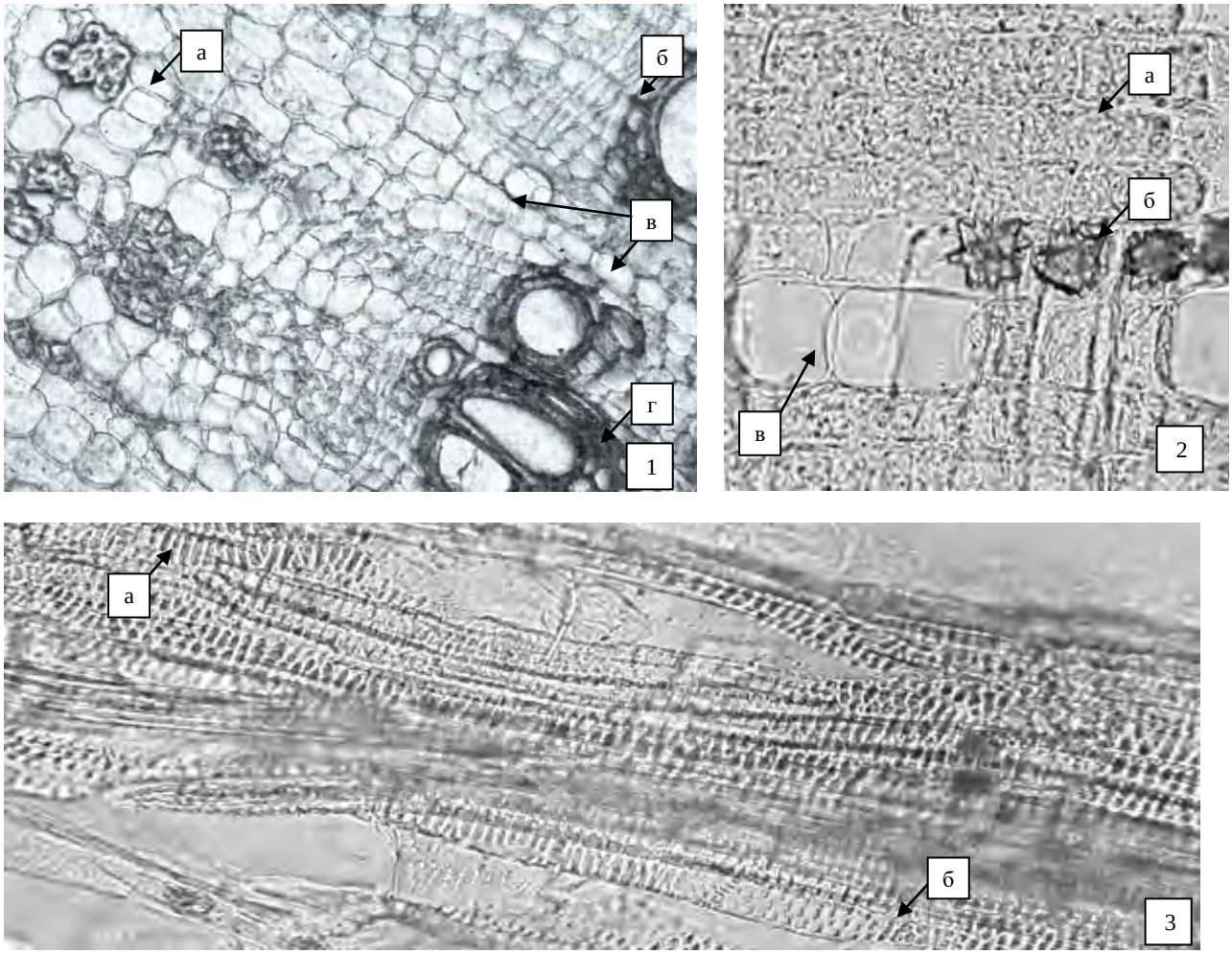
Порошок. При рассмотрении порошка под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видна смесь бесформенных кусочков волокнистой структуры желтовато-белого цвета, иногда почти белые, редко с частично сохранившейся сероватой или коричневато-серой пробкой и многочисленные небольшие группы почти белых волокон, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,2 мм. Запах слабый, характерный. Вкус водного извлечения сладковатый с ощущением слизистости.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.*При рассмотрении микропрепаратов поперечного среза корня должна быть видно, что корень имеет вторичное строение.В очищенном сырье в большинстве случаев пробка отсутствует. Покровная часть состоит из клеток паренхимы с тонкими стенками. Клетки паренхимы заполнены крахмальными зернами, местами встречаются мелкие друзы оксалата кальция. Линия камбия узкая, четко выраженная. Сосуды спиральные с простыми и окаймленными порами. Древесина состоит из тонкостенных клеток паренхимы, крупных сосудов, лежащих одиночно или небольшими группами и мелких групп лубяных волокон со слабо утолщенными неодревесневшими стенками, расположенными прерывистыми концентрическими поясами, с заостренными, реже вилообразно разветвленными концами. Сердцевинные лучи одно-, реже двухрядные. В паренхиме должны быть видны многочисленные крупные клетки со слизью, находящиеся как в коре, так и в древесине. Крахмальные зерна простые округлые или овальные, редко встречаются 2–5-сложные.

Измельченное сырье. При рассмотрении "давленого" микропрепарата под микроскопом должны быть видны фрагменты паренхимы с друзами оксалата кальция, фрагменты паренхимы с крахмальными зернами, фрагменты паренхимы с клетками со слизью, группы лубяных волокон со слабо утолщенными неодревесневшими стенками с заостренными, реже

вилообразно разветвленными концами, фрагменты сетчатых и лестничных сосудов. Крахмальные зерна простые округлые или овальные, редко встречаются 2–5-сложные. В микропрепарате могут быть видны фрагменты пробки.

Порошок. Под микроскопом должны быть видны фрагменты паренхимы с друзами оксалата кальция, фрагменты паренхимы с крахмальными зернами округлой или овальной формы, фрагменты волокон со слабо утолщенными неодревесневшими стенками, часто встречаются их вилообразно разветвленные окончания, фрагменты сетчатых и лестничных сосудов. Встречаются отдельные друзы и крахмальные зерна. Могут встречаться фрагменты пробки.



Рисунок–Алтея корни.
1 – поперечный срез корня: а– группа лубяных волокон, б– камбий, в – сердцевинный луч, г – сосуды (200×), 2 – клетки паренхимы с частично клейстеризованными крахмальными зернами (а) и друзами оксалата кальция

(б), крупные слизевые клетки (в) (200×), 3 – лестничные (а) и сетчатые (б) сосуды (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

1. При смачивании излома корня или порошка корня аммиака раствором 10 % или натрия гидроксида раствором10 % появляется желтое окрашивание (слизь).

2. При нанесении на излом корня или порошок корня 2–3 капель раствора йода должно наблюдаться синее окрашивание (крахмал).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок*–не более 14 %.

Зола общая.*Цельное сырье,измельченное сырье,порошок*– не более 8 %.

Зола,нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок*–не более 0,5 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье:*частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, –не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %.*Порошок:*частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, –не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, –не более 5 %.

Посторонние примеси

Деревянистые корни. *Цельное сырье*– не более 3 %.

Корни, плохо очищенные от пробки. *Цельное сырье*– не более 3 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье,измельченное сырье*– не более 0,5 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок*–не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок:*экстрактивных веществ, извлекаемых водой, –не менее 15 %.

Определение экстрактивных веществ, извлекаемых водой, проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод холодного настаивания по ОФС «Настои и отвары», из навески 1,0 гсырья).

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Аниса обыкновенного плоды **ФС.2.5.0057.18**

Anisi vulgaris fructus **Взамен ГФ XI ст. 30**

Собранные зрелые и высушенные плоды культивируемого однолетнего травянистого растения аниса обыкновенного (бедренца анисового) – *Anisum vulgare Gaertn*. (*Pimpinella anisum* L.), семейство сельдерейных –*Apiaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Плоды – вислоплодники, состоящие из двух не отделенных друг от друга полуплодиков (мерикарпиев), иногда распавшиеся, иногда с плодоножкой. Плоды яйцевидной или обратногрушевидной формы, с боков слегка сплюснутые, к основанию более широкие, к верхушке суженные. На верхушке имеются остатки пятизубчатой чашечки и вздутый надпестичный диск с двумя расходящимися столбиками. Поверхность плода шероховатая.



Рисунок 1 – Внешний вид аниса обыкновенного плодов.

Наружная сторона мерикарпия выпуклая, внутренняя – плоская. Каждый мерикарпий имеет пять слабо выступающих продольных ребрышек: три из них находятся на выпуклой стороне, два по бокам. В мерикарпии одно се-

мя, сросшееся с околоплодником. Длина плодов 3-5 мм, ширина 2-3 мм. Цвет плодов желтовато-серый или коричневато-серый. Запах сильный, ароматный. Вкус водного извлечения сладковато-пряный.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* На поперечном срезе плода должен быть виден эпидермис (экзокарпий) околоплодника, имеющий многочисленные одно-, реже двух клеточные, слегка изогнутые бородавчатые волоски. В паренхиме мезокарпия должны быть видны многочисленные (15-35 в одном мерикарпии) эфирномасличные канальцы и 5 мелких проводящих пучков (в ребрышках). Эндокарпий и семенная кожура плотно срослись и видны в виде желто-коричневого слоя деформированных клеток. Эндосперм состоит из многоугольных клеток, заполненных алейроновыми зернами, каплями жирного масла и мелкими друзами оксалата кальция.

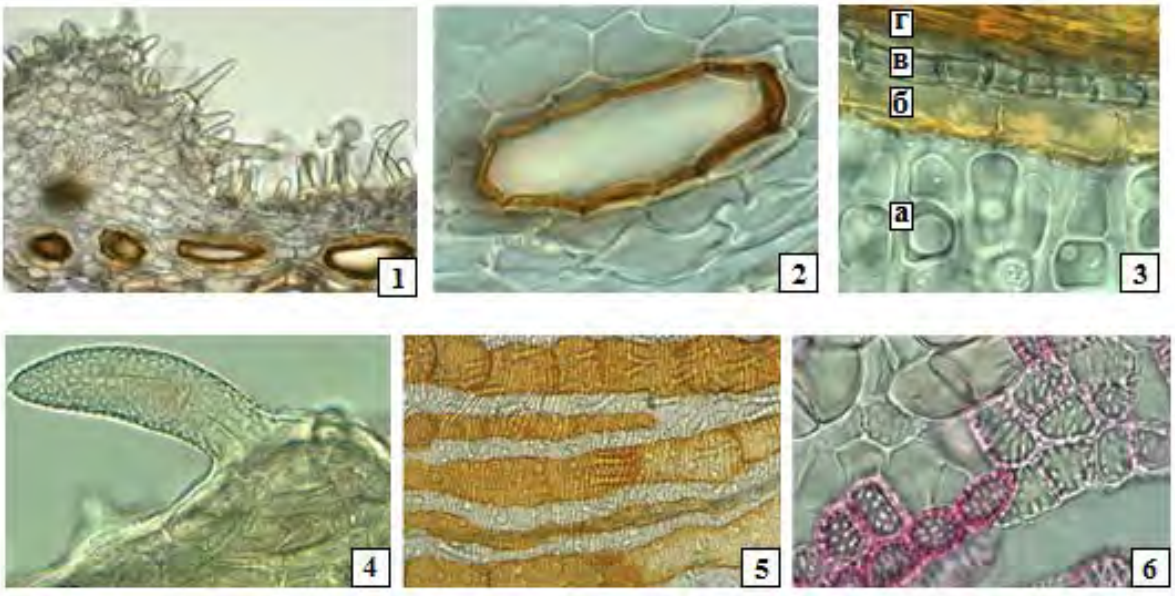


Рисунок 2 – Аниса обыкновенного плоды.

1 – поперечный разрез через ребро (200×); 2 – эфиромасличные канальцы (400×); 3 – поперечный срез аниса: а – эндосперм, б – кожура семени, в – эндокарпий, г – мезокарпий (600×); 4 – экзокарпий (эпидерма с одноклеточными волосками с бородавчатой кутикулой) (600×); 5 – продольный срез: эфиромасличные канальцы (56×); 6 – склереиды мезокарпия (280×).

Определение основных биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) судана III. Около 0,005 г СО судана III растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор стандартного образца (СО) ментола. Около 0,01 г СО ментола растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном отсвета месте.

Около 1,0 г сырья, измельченного до отсутствия цельных плодов, помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 10,0 мл спирта 96 % и кипятят с обратным холодильником на водяной бане в течение 20 мин. После охлаждения до комнатной температуры извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят раствора в виде полосы длиной 10 мм и шириной не более 3 мм 20 мкл (0,02 мл) испытуемого и рядом по 5,0 мкл (0,005 мл) раствора СО судана III и раствора СО ментола.

Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин смесью растворителей толуол-этилацетат (95:5), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, её вынимают из камеры и сушат до удаления следов растворителей. Пластинку обрабатывают ванилина раствором 0,0005 %, выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100 ÷ 105 °С в течение 2 – 3 мин после чего сразу же просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО ментола должна обнаруживаться зона адсорбции сине-фиолетового или сине-голубого цвета.

На хроматограмме раствора СО судана III выше должна обнаруживаться зона адсорбции синего или красновато-фиолетового цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должно обнаруживаться не менее 7 зон адсорбции (в порядке возрастания): голубого цвета, синего цвета на уровне зоны адсорбции СО ментола, жёлтого цвета, фиолетового цвета, розово-фиолетового цвета на уровне зоны адсорбции СО судана III, выше фиолетового цвета и сине-фиолетового цвета; допускается обнаружение других зон адсорбции (терпеноиды).

Газовая хроматография

Испытание проводится методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии.

Для анализа используют испытуемый раствор (см. раздел «Тонкослойная хроматография»).

Условия хроматографирования

Колонка	капиллярная HP-5MS, 30 м × 0,25 мм; толщина пленки неподвижной фазы 0,25 мкм, или аналогичная
Температура колонки, °С	начальная 50 °С, выдержка 2 мин; подъем 10 °С/мин до 150 °С, выдержка 0 мин; подъем 15 °С/мин до 280 °С, выдержка 10 мин
Температура инжектора	280 °С
Объем вводимой пробы, мкл	1,0
Деление потока	(20 : 1)
Температура интерфейса	280 °С
Газ-носитель	гелий
Расход газов, мл/мин	0,8
Сканирование	по полному ионному току, диапазон масс 29 ÷ 500, задержка на выход растворителя 2,5 мин;
Детектор	масс-спектрометрический.

Хроматографируют испытуемый раствор в указанных выше условиях.

На хроматограмме испытуемого раствора должны регистрироваться основные пики: анисового альдегида с временем удерживания около 11,58 мин и анетола с относительным временем удерживания (по анисовому альдегиду) около 1,05.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье* – не более 12 %.

Зола общая. *Цельное сырье* – не более 10 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье* – не более 2,5 %.

Посторонние примеси

Поврежденных, недоразвитых плодов аниса и других частей. *Цельное сырье* – не более 5 %.

Органическая примесь. *Цельное сырьё* – не более 2,0 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье* – не более 1 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырьё:* эфирного масла – не менее 1,5 %.

Определение эфирного масла проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания эфирного масла в лекарственном раститель-

ном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1 или 2, из 10,0 г сырья, измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, время перегонки 2 ч.)

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Аралии маньчжурской корни **ФС.2.5.0058.18**

Araliae elatae radices **Взамен ГФ XI ст. 65**

Собранные весной или поздней осенью, тщательно очищенные от земли, разрубленные на куски и высушенные корни дикорастущего дерева аралии высокой (аралии маньчжурской) – *Aralia elata* (Miq.) Seem (A. Mandshurica Rupr. et maxim.) сем. аралиевых – *Araliaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Смесь цельных или продольно расщепленных кусков корней длиной до 8 см и диаметром до 3 см, с немногочисленными мелкими боковыми корнями. Корни легкие, продольно-морщинистые, с сильно шелушащейся пробкой. Кора тонкая, легко отделяется от древесины. Излом корня занозистый.

Цвет корней снаружи коричневато-серый, на изломе беловато- или желтовато-серый. Запах специфический. Вкус водного извлечения слегка вяжущий, горьковатый.

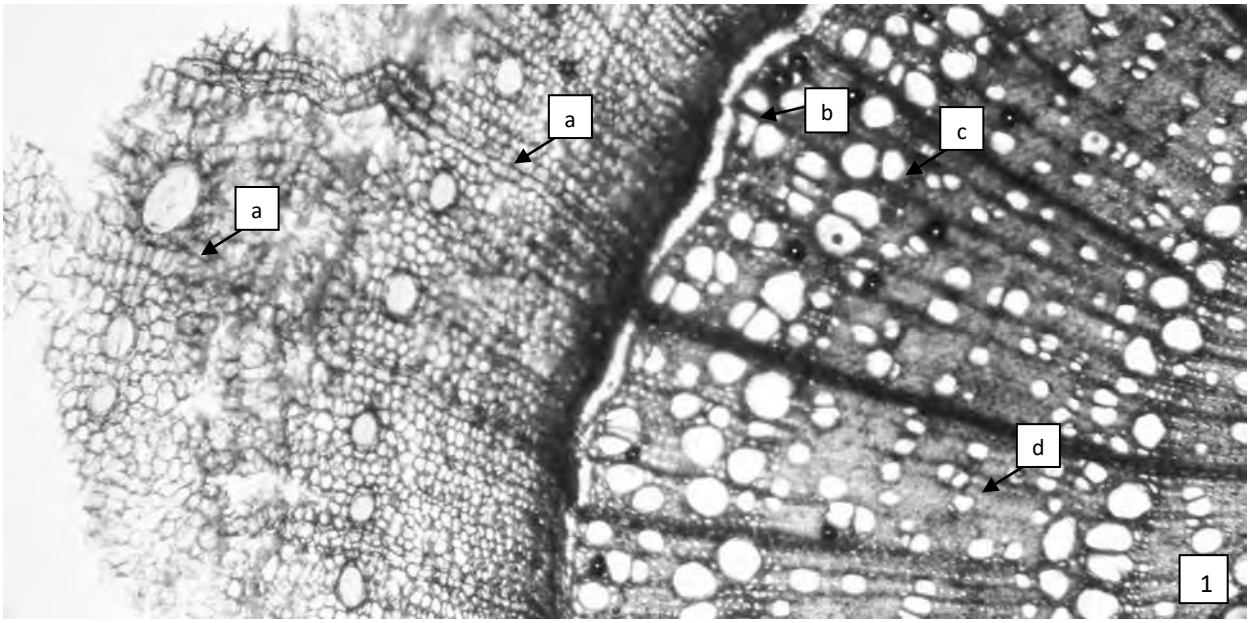
Измельченное сырье. Кусочки корней различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.

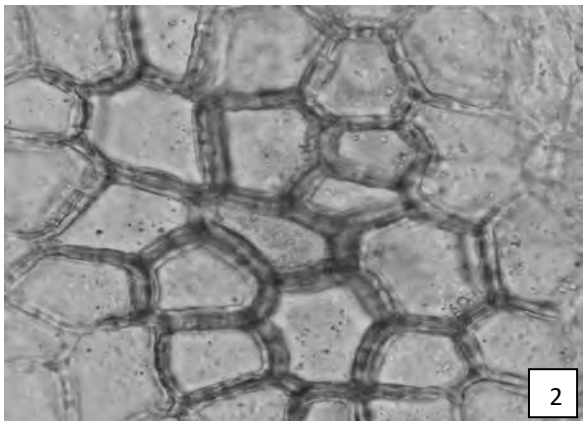
Цвет желтовато-серый, коричневато-серый. Запах специфический. Вкус водного извлечения слегка вяжущий, горьковатый.

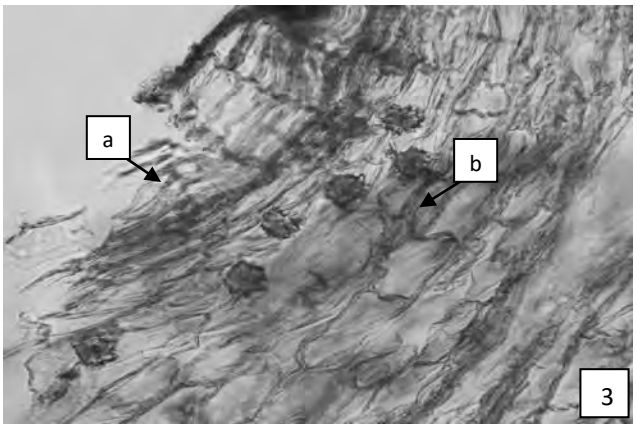
Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении поперечного среза должен быть виден слой сильно шелушащейся пробки. Наружная кора состоит из тонкостенных овальных клеток паренхимы, в которых ближе к пробке встречаются друзы оксалата кальция. Также в паренхиме расположены концентрическими поясами секреторные каналы диаметром от 7 до 20 мкм. Паренхимные клетки около секреторных каналов и клетки сердцеви-

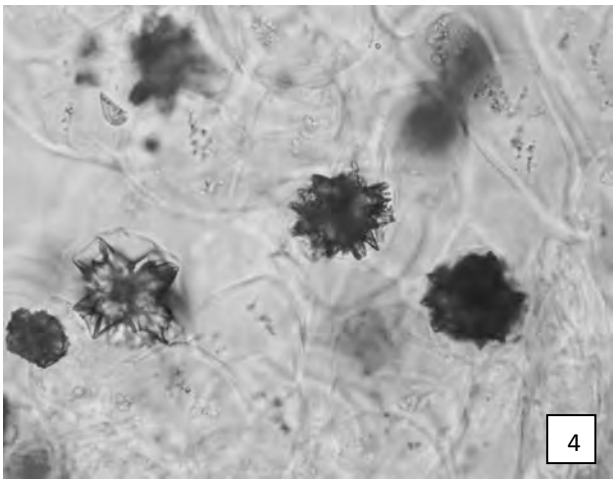
ны лучей заполнены крахмальными зернами. Крахмальные зерна простые и 2-8 сложные. Кора отделена от древесины узким слоем камбия. Древесина кольцесосудистая. Сердцевинные лучи одно-пятирядные.

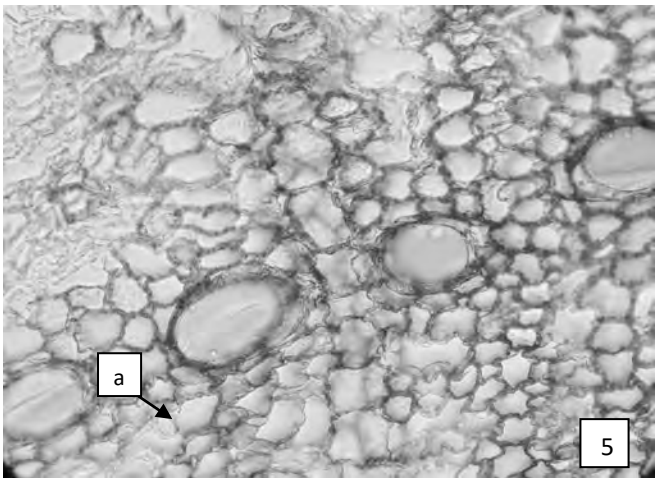
Измельченное сырье. При рассмотрении «давленого» препарата должны быть видны фрагменты пробковой ткани, состоящей из многоугольных или прямоугольных клеток с четковидноутолщенными стенками, фрагменты спиральных и пористых сосудов с простыми или окаймленными порами, волокнистых трахеид, волокон либриформа, секреторных каналов, одиночные крахмальные зерна и друзы оксалата кальция.


a
a
b
c
d
1


2


a
b
3


4


a
5

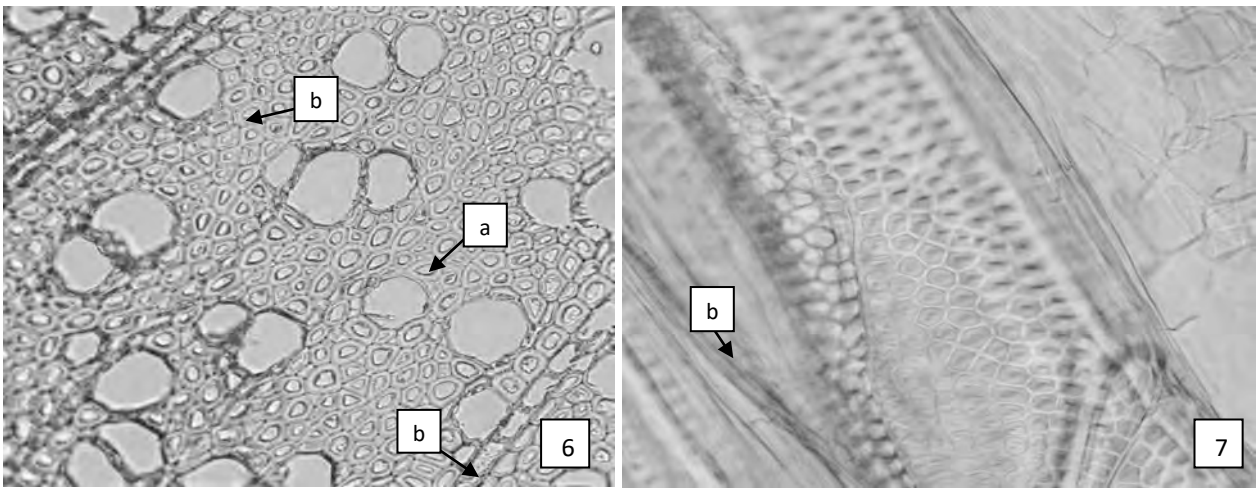


Рис. 1. Аралии маньчжурской корни

1 – фрагмент поперечного среза: концентрический пояс секреторных каналов (a), камбий (b), сосуды (c), сердцевинные лучи (d) (40×); 2 – фрагмент пробки (200×); 3 – фрагмент поперечного среза: пробка (a), друзы (b) (100×); 4 – друзы (400×); 5 – фрагмент коры с концентрическим поясом секреторных каналов (a) (100×); 6 – сосуды (a), сердцевинные лучи (b) (100×); 7 – пористый сосуд с окаймленными порами (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Около 1,0 г измельченного сырья (см. раздел «Количественное определение») помещают в коническую колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 20 мл метанола и кипятят с обратным холодильником на водяной бане с температурой 80 - 85 °С в течение 1 ч. После охлаждения извлечение декантируют (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флюоресцентным индикатором наносят 20 мкл (0,02 мл) испытуемого раствора в виде полосы длиной 10 мм и шириной не более 2 мм.

Пластинку с нанесенной пробой высушивают на воздухе в течение 10 мин, затем помещают в камеру со смесью растворителей хлороформ – метанол - вода (61:32:7) и хроматографируют восходящим способом. После

того как фронт растворителей пройдет 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей.

Пластинку обрабатывают серной кислотой раствором 20 %, выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100 – 105 °С в течение 10 мин и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме испытуемого раствора должно обнаруживаться не менее двух зон адсорбции красновато-фиолетового или фиолетового цвета (аралозиды); допускается обнаружение других зон адсорбции красновато-фиолетового или фиолетового, а также зон адсорбции другого цвета.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 14 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 7 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 4 %.

Кусков корней длиной более 8 см. *Цельное сырье* – не более 15 %.

Кусков корней диаметром более 3 см. *Цельное сырье* – не более 15 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* измельченных частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; измельченных частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,25 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Корней, изменивших окраску в изломе (потемневших). *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 4 %.

Органической примеси. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1 %.

Минеральной примеси. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье:* суммы аралозидов в пересчете на аммонийную соль аралозидов А, В, С с усредненной молекулярной массой – не менее 5 %.

Сумма аралозидов в пересчете на аммонийную соль аралозидов А, В, С с усредненной молекулярной массой

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 5,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в патрон из фильтровальной бумаги и опускают в экстрактор аппарата Сокслета с рабочим объемом 150 - 200 мл. В колбу – приемник прибавляют 250 мл метанола, 70 мл серной кислоты раствора 50 % и экстрагируют на кипящей водяной бане в течение 7 ч. Полученную в приемнике смесь разбавляют водой вдвое и охлаждают под краном в течение 10 мин. Выпавший осадок отфильтровывают через стеклянный фильтр ПОР 16 диаметром не менее 50 мм. Первую порцию фильтруют без вакуума, затем, когда отделение фильтрата почти прекратится, осторожно включают вакуум и фильтруют оставшуюся часть. Осадок на фильтре промывают водой (1000 мл), взмучивая его на фильтре 2-3 раза до нейтральной реакции по универсальной индикаторной бумаге, и затем подсушивают, не выключая вакуума. С воронки осадок количественно переносят 50 мл горячей смеси метанола и изобутилового спирта (1:1,5) в стеклянный стакан вместимостью 100 мл (испытуемый раствор).

Полученный испытуемый раствор титруют потенциометрически 0,1 М раствором натрия гидроксида в смеси метанола и бензола с использованием стеклянного индикаторного электрода. При титровании отмечают количество титранта, израсходованного на доведение испытуемого раствора до pH 7,0.

Параллельно проводят контрольный опыт.

Содержание суммы аралозидов в пересчете на аммонийную соль аралозидов A, B, C с усредненной молекулярной массой в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{0{,}10422 \cdot (V - V_1 - V_2) \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot (100 - W)} = \frac{1042{,}2 \cdot (V - V_1 - V_2)}{a \cdot (100 - W)}$$

где 0, 10422 – количество аммонийных солей аралозидов, соответствующее 1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида, г;

V – объем 0,1 М раствора натрия гидроксида, израсходованного на титрование испытуемого раствора, мл;

V_1 – объем 0,1 М раствора натрия гидроксида, израсходованного на доведение pH титруемого раствора до 7,0; мл;

V_2 – объем 0,1 М раствора натрия гидроксида, израсходованного на титрование контрольного опыта, мл;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Аронии черноплодной свежие плоды **ФС.2.5.0002.15**

Aroniae melanocarpaerecens fructus

Собранные свежие и зрелые плоды многолетнего культивируемого кустарника или небольшого дерева аронии черноплодной – *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott., сем. розоцветных – *Rosaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

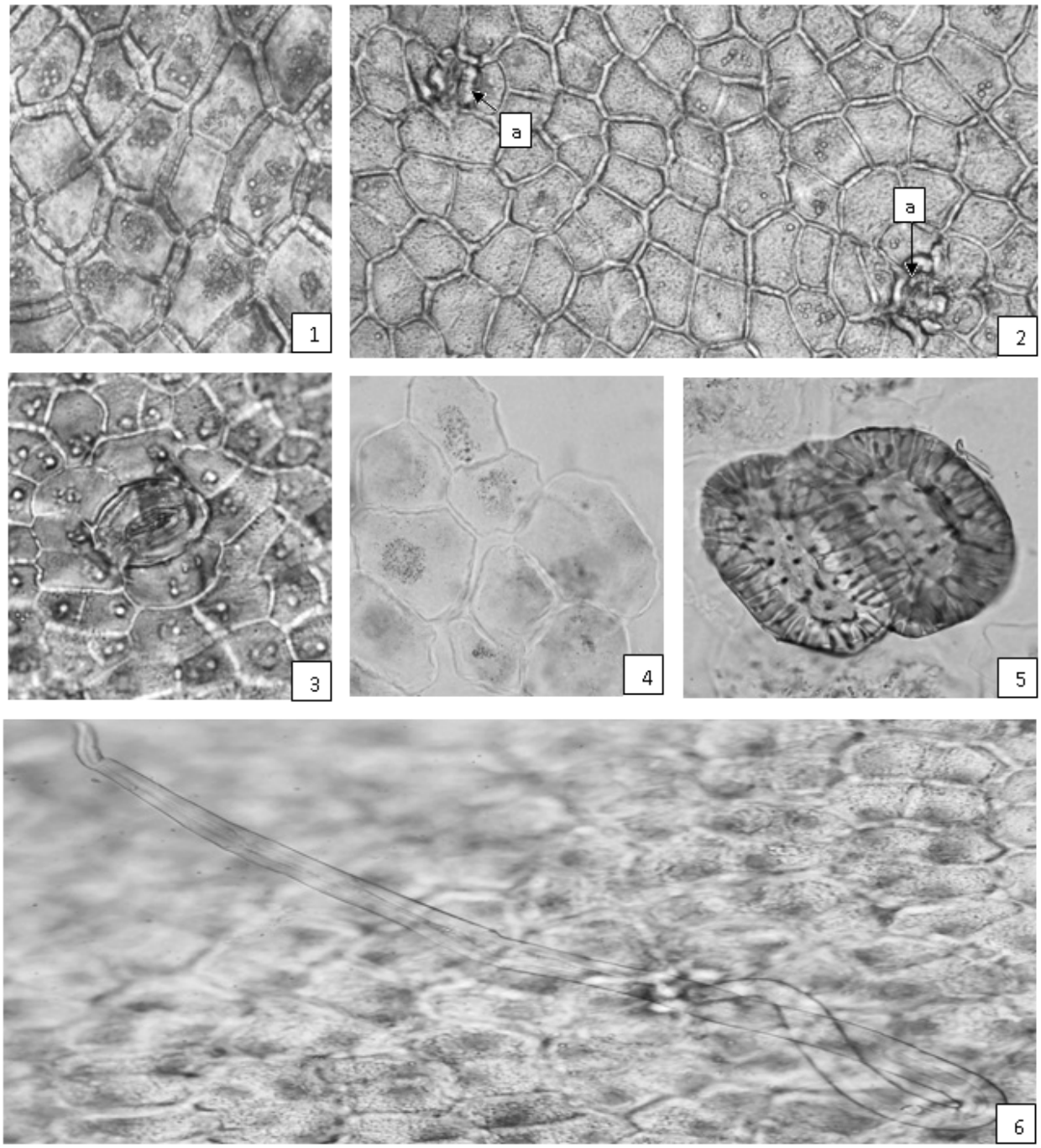
Внешние признаки*.Цельное сырье.* Плоды шаровидные или чуть вытянутые, яблокообразные, до 1,5 см в диаметре, голые, черные, блестящие, иногда с сизым налетом, реже темно-красные, сочные. Плодолистики внутри плода образуют 5 гнезд, в которых расположены семена. Мякоть плода образована сильно разросшимся гипантием, на верхушке плода имеются малозаметные чашелистики. Внутри плода под чашелистиками заметно скопление большого числа волосков, похожее на паутину. Оно остается от завязи, имеющей на верхушке железисто-волосистое опушение. Семена в очертании удлиненно обратнояйцевидные, красновато-коричневые, неясно продольно морщинистые, до 3 мм длиной. Один плод содержит 4–8 семян, часть их недоразвита. Запах слабый. Вкус плодов кисловато-сладкий, вяжущий.

Микроскопические признаки*. Цельное сырье*. При рассмотрении эпидермиса с поверхности должны быть видны толстостенные полигональные клетки, в боковых стенках которых могут быть видны поры. В основном, на эпидермисе верхушки плода встречаются устьица (аномоцитного типа) и простые, одноклеточные, длинные, извивающиеся волоски, в месте прикрепления волоска стенки клеток эпидермиса

неравномерно утолщены, образуют розетку. Различимы следы от отвалившихся волосков благодаря неравномерной утолщенности стенок у клеток, прилегающих к месту крепления волосков.

Экзокарпий плодов состоит из нескольких рядов колленхимы, расположенной непосредственно под эпидермисом. Клетки паренхимы, следующего глубже мезокарпия, постепенно укрупняются вовнутрь. В паренхиме мезокарпияимеются многочисленные склереиды неправильной, чаще округлой формы, со сглаженными углами, объединенные в группы из 2–3 и более клеток, пронизанные многочисленными поровыми каналами. Каменистые клетки имеют неодинаковую утолщенность стенок. В мякоти плодов в значительном количестве присутствуют друзы оксалата кальция и призматические кристаллы, которые располагаются группами в виде тяжей. Кристаллы имеют правильную призматическую форму, реже ромбическую. Друзы располагаются группами и одиночно.

Семена состоят из зародыша, эндосперма, перисперма и семенной кожуры. Эпидермис семенной кожуры состоит из тонкостенных, ослизняющихся, полигональных клеток.Под тонкостенным эпидермисом находятся широкопросветные клетки склеренхимы коричневого цвета, далее располагаются 2–3 ряда спавшейся паренхимы, 1 ряд клеток с порами в боковых стенках, далее следует остаток перисперма. В эндосперме и зародыше содержится жирное масло. Клетки эндосперма заполнены мелкими алейроновыми зернами. Слой эндосперма незначителен и представлен 5–7 рядами клеток. Паренхима семядолей образована рядами высоких, палисадных пористых клеток.



Рисунок–Ароniичерноплодной свежие плоды.
1 – фрагмент эпидермиса с порами в боковых стенках (400×); 2 – фрагмент эпидермиса с местами прикрепления волосков (а) (200×); 3 –фрагмент эпидермиса с устьицем аномоцитного типа(200×); 4 – фрагмент мякоти (200×); 5 – каменистые клетки (200×);6 – фрагмент эпидермиса с простым волоском (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагелянаносят 5 мкл испытуемогораствора (см. раздел «Количественное определение» приготовление раствора А).Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщеннуюв течение 1 ч смесью растворителей бутанол– уксусная кислоталедяная –вода (4:1:2), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 –90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и просматривают придневном свете.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции фиолетового цвета; допускается обнаружение других зон адсорбции(антоцианы).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье*– не менее 70 % и не более 83 % (в соответствии с требованиями ОФС «Определение влажности в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»).

Зола общая. *Цельное сырье*– не более 2 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье* – не более 0,5 %.

Посторонние примеси

Недозрелыеплоды. *Цельное сырье*– не более 2 %.

Ветки и другие части растения (в том числе отделенные при анализе). *Цельное сырье*–не более 0,5 %.

Плоды, поврежденные вредителями. *Цельное сырье*–не более 0,5 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье*–не более 2 %.

Минеральнаяпримесь. *Цельное сырье*–не более 0,5%.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС

«Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье:*сумма антоцианов в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид–не менее 4 %.

Около 1,0 г (точная навеска) сырья, измельченного до отсутствия цельных плодов, помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл с притертой пробкой и прибавляют 30 мл спирта 96 %, содержащего 1 % хлористоводородной кислотыконцентрированной. Экстракцию проводят при комнатной температуре в течение 120 мин при постоянном перемешивании. Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр с красной полосой в колбу темного стекла (раствор А).

1,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (раствор Б).

Оптическую плотность раствораБизмеряют на спектрофотометре при длине волны 534 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют спирт 96 %, содержащий 1 % хлористоводородной кислотыконцентрированной.

Содержание суммы антоцианов в пересчете на цианидина-3-О-глюкозид иабсолютно сухое сырье впроцентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 30 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 75000}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где *A* – оптическая плотность раствора Б;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$–удельный показатель поглощения цианидин-3-О-глюкозида при длине волны 534 нм, равный 100;

a– навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов». Свежие плоды загружают в деревянные бочки массой нетто 150 кг.

Хранение.На приемных пунктах плоды хранят в прохладном месте не более 3 сут со дня сбора, а при температуре не выше 5 °С – до 2 мес, разложив их тонким слоем.

Аронии черноплодной сухие плоды **ФС.2.5.0003.15**

Aroniae melanocarpaesiccofructus

Зрелые, высушенные плоды многолетнего культивируемого кустарника или небольшого дерева аронии черноплодной – *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott., сем.розоцветных – *Rosaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки*.Цельное сырье*. Плоды диаметром 3 – 6 мм, бесформенные, сильно сморщенные, в размоченном виде шаровидные. Плодолистики внутри плода образуют 5 гнезд, в которых расположены семена. Мякоть плода образована сильно разросшимся гипантием, на верхушке плода имеются малозаметные чашелистики. Внутри плода под чашелистиками заметно скопление большого числа волосков, похожее на паутину. Оно остается от завязи, имеющей на верхушке железисто-волосистое опушение. Семена в очертании удлиненно обратнояйцевидные, красновато-коричневые, неясно продольно морщинистые, до 3 мм длиной. Плоды черно-синего цвета с сизоватым сиянием. Запах слабый.Вкус водного извлечения кисловато-сладкий, вяжущий.

Микроскопические признаки*.Цельное сырье*. Клетки эпидермиса имеют полигональные очертания, местами в боковых стенках должны быть видны поры. На поверхности эпидермиса имеются простые, одноклеточные, длинные, извивающиеся волоски. Различимы следы от отвалившихся волосков благодаря неравномерной утолщенности стенок клеток, прилегающих к месту крепления волосков.

Экзокарпий плодов состоит из нескольких рядов колленхимы,

расположенной непосредственно под эпидермисом. Клетки паренхимы, следующего глубже мезокарпия, постепенно укрупняются вовнутрь. В паренхиме мезокарпия имеются многочисленные склереиды неправильной, чаще округлой формы, со сглаженными углами, объединенные в группы из 2,3 и более клеток, пронизанные многочисленными поровыми каналами. Каменистые клетки имеют неодинаковую утолщенность стенок. В мякоти плодов в значительном количестве присутствуют друзы оксалата кальция и призматические кристаллы, которые располагаются группами в виде тяжей. Кристаллы имеют правильную призматическую форму, реже ромбическую. Друзы располагаются группами и одиночно.

Семена состоят из зародыша, эндосперма, перисперма и семенной кожуры. Эпидермис семенной кожуры состоит из тонкостенных, ослизняющихся, полигональных клеток. Под тонкостенным эпидермисом находятся широкопросветные клетки склеренхимы коричневого цвета, далее располагаются 2 – 3 ряда спавшейся паренхимы, 1 ряд клеток с порами в боковых стенках, далее следует остаток перисперма. В эндосперме и зародыше содержится жирное масло. Клетки эндосперма заполнены мелкими алейроновыми зернами. Слой эндосперма незначителен и представлен 5 – 7 рядами клеток. Паренхима семядолей образована рядами высоких палисадных пористых клеток.

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 5 мкл испытуемого раствора (см. раздел «Количественное определение»приготовление раствора А).Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 1 чсмесью растворителей бутанол– уксусная кислоталедяная –вода (4:1:2), и хроматографируют восходящим

способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 -90 % длиныпластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителейи просматривают придневном свете.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции фиолетового цвета;допускается обнаружение других зон адсорбции(антоцианы).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. Цельное сырье -не более 17 %.

Зола общая.*Цельное сырье*-не более 3 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье* – не более 0,5 %

Посторонние примеси

Недозрелые плоды.*Цельное сырье*-не более 1 %.

Ветки и другие части растения (в том числе отделенные при анализе).*Цельное сырье*не более 0,5 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье*-не более 2 %.

Минеральная примесь.*Цельное сырье*-не более 0,5 %.

Тяжелые металлыи мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье*:сумма антоцианов в пересчете на цианидин-3-О-глюкозидне менее 3 %.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц,

проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл с притертой пробкой и прибавляют 30 мл спирта 96 %, содержащего 1 % хлористоводородной кислотыконцентрированной. Экстракцию проводят при нагревании на водяной бане в течение 30 мин. Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр с красной полосой во флакон темного стекла (раствор А).

1,0 мл растворАпомещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (раствор Б).

Оптическую плотность растворБизмеряют на спектрофотометре при длине волны 534 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют спирт 96 %, содержащий 1 % хлористоводородной кислотыконцентрированной.

Содержание суммы антоцианов в пересчете на цианидина-3-О-глюкозид и абсолютно сухое сырье в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 30 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 75000}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где *A* – оптическая плотность раствора Б;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$–удельный показатель поглощения цианидин-3-О-глюкозида при длине волны 534 нм, равный 100;

a– навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных

препаратов».

Багульника болотного побеги **ФС.2.5.0059.18**

Ledi palustris cormus **Взамен ГФ XI ст. 1**

Собранные в августе – сентябре в фазу созревания плодов и высушенные олиственные побеги текущего года дикорастущего вечнозеленого кустарника багульника болотного – *Ledum palustre* L., сем. вересковых – *Ericaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Смесь олиственных побегов, листьев и небольшого количества плодов. Листья очередные, на коротких черешках, кожистые, линейно-продолговатые или продолговатые или продолговато-эллиптические, цельнокрайние, длиной 15 – 45 мм, шириной 1 – 5 мм, с завернутыми вниз краями; с верхней стороны темно-зеленые, блестящие; с нижней стороны покрыты густым оранжево-коричневым войлочным опушением. Стебли цилиндрические с оранжево-коричневым войлочным опушением. Плод - многосемянная продолговатая коробочка 3 – 8 мм длиной, железисто-опушенная, раскрывающаяся при созревании снизу вверх пятью створками.

Запах резкий, специфический. Вкус водного извлечения не определяется.

Измельченное сырье. Смесь кусочков стеблей, листьев и плодов, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм. При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) должны быть видны фрагменты листовой пластинки с блестящей неровной поверхностью светло-серого, серовато-зеленого, темно-зеленого, коричневато-

зеленого цвета (верхняя кожистая сторона) или покрытые густым оранжево-коричневым опушением (нижняя сторона); кусочки черешков и цилиндрических стеблей с оранжево-коричневым войлочным опушением, иногда расщепленные вдоль со светло-желтой пористой сердцевиной; отдельные светло-желтые и желтые фрагменты сердцевины стеблей; железисто-опушенные кусочки плода-коробочки, отдельные фрагменты створок.

Цвет зеленый, темно-зеленый, оранжево-коричневый, серовато-коричневый. Запах резкий, специфический. Вкус водного извлечения не определяется.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье, измельченное сырье.* При рассмотрении листа с поверхности должны быть видны клетки эпидермиса с обеих сторон листа - мелкие с тонкими или четковидноутолщенными извилистыми стенками, над жилками - с прямыми. Устьица только на нижней стороне, крупные, приподнятые, с 4-8 околоустьичными клетками (аномоцитный тип). Верхняя сторона листа покрыта толстой кутикулой; волоски встречаются редко. Нижняя сторона густо опушена волосками трех типов: простые длинные, многоклеточные, лентовидные, извилистые и перекрученные волоски, состоящие из двух рядов клеток, с красно-коричневым содержимым; мелкие простые одноклеточные волоски с толстой оболочкой, покрытой бородавчатой кутикулой; головчатые волоски на одно- или многоклеточной ножке с многоклеточной округлой головкой, содержащей маслянистые капли.

Эфиромасличные железки встречаются на обеих сторонах листа, но больше на нижней; они состоят из крупной округлоприплюснутой головки, образованной клетками двух типов: 6-10 мелких округлых клеток, расположенных у основания железки, и 10-12 крупных почти плоских клеток, образующих купол над первыми; ножка железки короткая двухрядная, из нескольких мелких клеток. Мезофилл листа характеризуется ярко выраженной аэренхимой и содержит друзы оксалата кальция, реже одиночные призматические кристаллы и их сростки.

При рассмотрении «давленого» препарата стебля должны быть видны прямоугольные вытянутые клетки эпидермиса с прямыми стенками, на поверхности встречаются волоски и эфирномасличные железки; клетки паренхимы овальной формы; механические волокна; сосуды спирального типа.

При рассмотрении «давленого» препарата створок коробочки должны быть видны клетки эпидермиса многоугольной формы, простые одноклеточные волоски, и эфиромасличные железки, имеющие короткую ножку и округлую головку; в мезофилле встречаются пласты каменистых клеток.

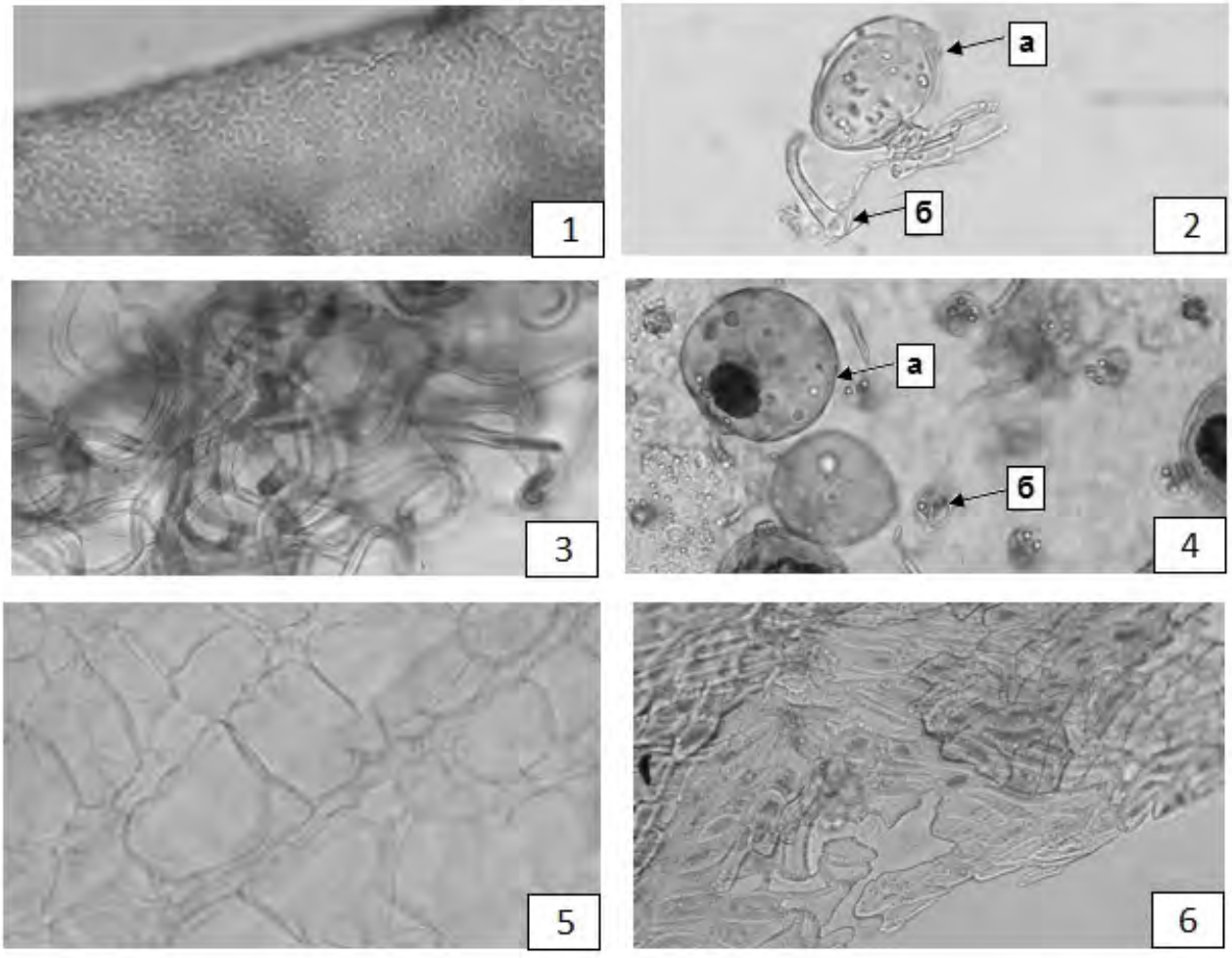


Рис. 1. Багульника болотного побеги
1 – фрагмент эпидермиса листьев (200×); 2 – фрагмент с эфирномасличной железкой (а) и мелким одноклеточным волоском с толстой оболочкой, покрытой бородавчатой кутикулой (б) (200×); 3 – волоски: длинные, многоклеточные, лентовидные, извилистые и перекрученные волоски, состоящие, с красно-коричневым содержимым (200×); 4 – эфирномасличные железки (а), головчатый волосок на многоклеточной ножке с многоклеточной

округлой головкой, содержащей маслянистые капли (б) (200×); 5 – паренхимные клетки стебля (200×); 6 – пласт каменистых клеток плода (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов

Раствор стандартных образцов (СО) тимола и ментола. 5 мг тимола и 10 мг ментола растворяют в 10 мл спирта 96 % при перемешивании. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Испытуемый раствор. К 20 мкл масла, полученного при количественном определении, прибавляют 1 мл толуола.

На линию старта высокоэффективной хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят полосами 15 мкл (0,015 мл) испытуемого раствора и 20 мкл (0,02 мл) раствора СО тимола и ментола. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре, помещают в камеру со смесью растворителей этилацетат – толуол (5:95) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, обрабатывают анисового альдегида раствором спиртовым сернокислым, выдерживают при температуре от 100 – 105 °С в течение 5 – 10 мин и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО тимола и ментола должны обнаружиться зона адсорбции синего цвета (ментол) в нижней части и над ней зона адсорбции розового цвета (тимол).

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться: зона адсорбции от фиолетового до красновато-фиолетового цвета немного выше уровня зоны адсорбции СО ментола, а также зона от фиолетового до красновато-фиолетового цвета немного выше зоны адсорбции СО тимола; допускается обнаружение других зон адсорбции.

Качественная реакция

Около 2,0 г измельченного сырья, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 20 мл спирта 70 % и нагревают на водяной бане с обратным холодильником в течение 10 мин, охлаждают и фильтруют (испытуемый раствор).

К 1 мл испытуемого раствора прибавляют 2 капли железа(III) аммония сульфата раствора; должно наблюдаться черно-зеленое окрашивание (дубильные вещества).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 14 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 4 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1 %.

Измельченность сырья. *Измельченное сырье* – частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Стеблей серовато-коричневых. *Цельное сырье* – не более 10 %.

Кусочков стеблей серовато-коричневых. *Измельченное сырье* – не более 10 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье:* эфирного масла – не менее 0,1 %.

Эфирное масло.

В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»: метод 2, навеска 30,0 г измельченного сырья (без дополнительного измельчения) или цельного сырья, измельченного до величины частиц, размером 1 – 3 см, время перегонки – 4 ч, после перегонки охлаждение холодильника прекращают с тем, чтобы закристаллизовавшаяся часть эфирного масла на стенках холодильника расплавилась и опустилась в приемник.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Бадана толстолистного корневища **ФС.2.5.0004.15**

Bergeniae crassifoliae rhizomata

Собранные летом, освобожденные от земли, корней и надземных частей, разрезанные на куски и высушенные корневища дикорастущего и культивируемого многолетнего травянистого растения бадана толстолистного – *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch, сем. камнеломковых – *Saxifragaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

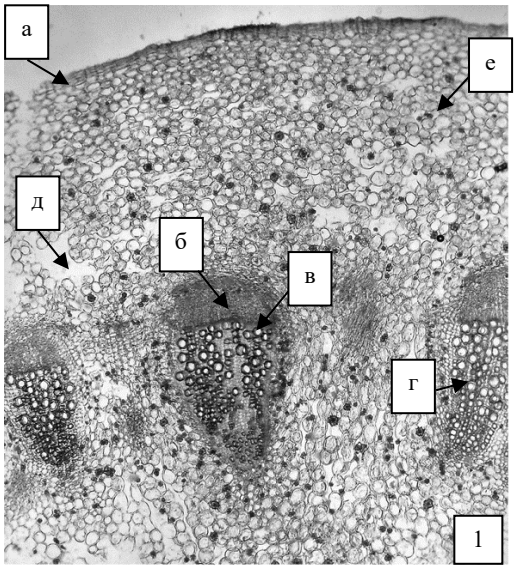
Внешние признаки. *Цельное сырье.* Куски корневищ цилиндрической формы длиной до 20 см, толщиной 1–3,5 см, имеющие на поверхности чешуевидные остатки черешков листьев и округлые следы корней. Цвет корневища и чешуй, покрывающих корневище, темно-коричневый или почти черный. На изломе корневище зернистое, светло-розовое или светло-коричневое. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения сильно вяжущий.

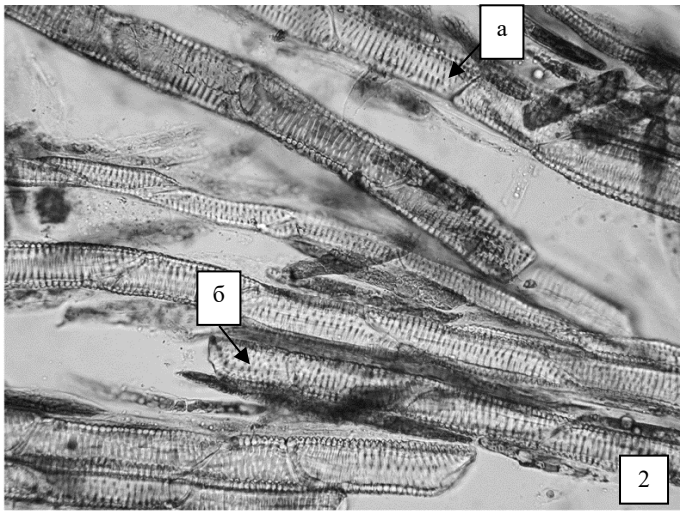
Измельченное сырье. Кусочки корневищ и чешуевидных остатков черешков листьев различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 5 мм. Цвет корневищ в изломе светло-розовый или светло-коричневый, цвет чешуй и пробки темно-коричневый или почти черный. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения сильно вяжущий.

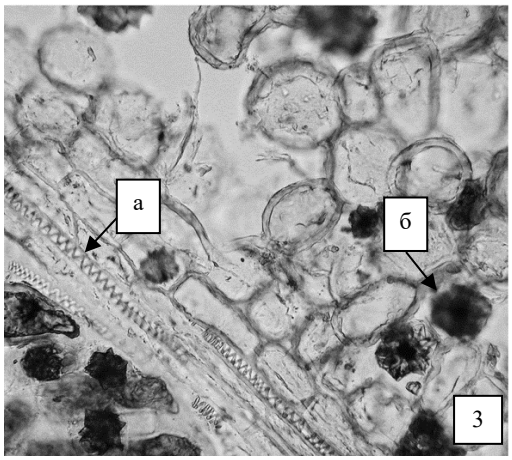
Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении поперечного среза должно быть видно, что корневище имеет пучковый тип строения. Покровная ткань состоит из 4–5 рядов клеток пробки. Проводящие пучки –открытые коллатеральные, расположены прерывистым кольцом. Паренхима коры, сердцевинных лучей и сердцевины состоит из крупных

тонкостенных округлых в поперечном сечении клеток, заполненных крахмальными зернами и друзами оксалата кальция. В паренхиме должны быть видны крупные межклетники (аэренхима). Крахмальные зерна простые, округлые.

Измельченное сырье. При рассмотрении «давленого»микропрепарата должны быть видны: группы паренхимных клеток, часто окрашенных в коричневый цвет (дубильные вещества), содержащих друзы оксалата кальция и крахмальные зерна, фрагменты лестничных, лестнично-сетчатых и, редко, спиральных сосудов, фрагменты пробки, состоящей из слоев толстостенных клеток. В препаратах соскоба сухого сырья должны быть видны крахмальные зерна, простые, округлые.







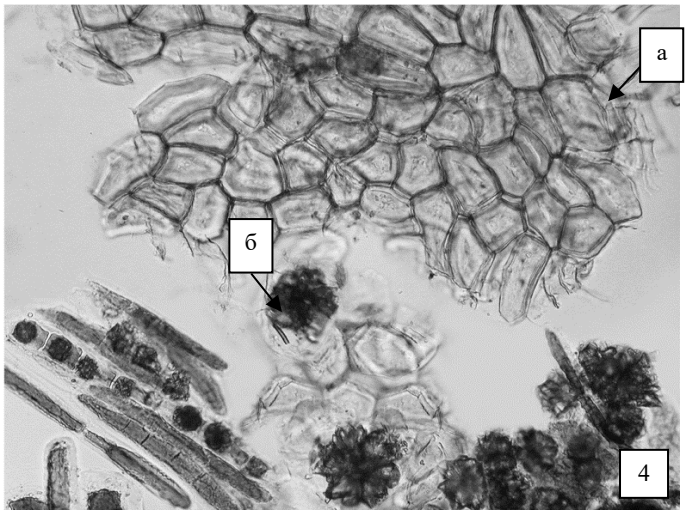


Рисунок – Бадана корневища.
1 – фрагмент поперечного среза корневища: а – пробка, б – элементы флоэмы, в – камбий, г – сосуды древесины, д – крупные межклетники, е – друзы оксалата кальция (40×);2 – сосуды: а – лестничные , б – лестнично-сетчатые (200×);3 – фрагменты корневища: а – фрагмент пучка спиральных сосудов, б – клетки паренхимы с друзами оксалата кальция (200×);
4 – фрагменты корневища: а – фрагмент пробки, б – клетки паренхимы с друзами оксалата кальция (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

1. *Тонкослойная хроматография*

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) арбутина. Около 0,01 г СО арбутина растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности растворане более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около 0,5 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящихсквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл спирта 50 %, нагревают на водяной бане с обратным холодильником в течение 10 мин. После охлаждения до комнатной температуры полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят по 5 мкл испытуемого раствора и раствора СО арбутина. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 40 мин смесью растворителей: этилацетат–муравьиная кислота безводная–вода (88:6:6), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 –90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей. Хроматограмму обрабатывают2,6-дихлорхинонхлоримида раствором 1 %, сушат, затем обрабатывают натрия карбоната раствором 2 %, сушат и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО арбутина должна обнаруживаться зона

адсорбции синего цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться зона синего цвета на уровне зоны СО арбутина, зона адсорбции синего или коричнево-синего цвета и зона коричневого цвета выше зоны арбутина; допускается обнаружение других зон(фенольные соединения).

2. ***Качественные реакции***

При смачивании излома корневищ, кусочков измельченного сырья или порошка железа(III) аммония сульфата раствором 1 % или железа(III) хлорида раствором 1 % должно наблюдаться черно-синее окрашивание (дубильные вещества).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье,измельченное сырье*–не более 14 %.

Зола общая. *Цельное сырье,измельченное сырье*–не более 8 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте.*Цельное сырье,измельченное сырье* –не более 0,5 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, – не более 5 %.*Измельченное сырье*– частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Корни, надземные части, в том числе отделенные при анализе. *Цельное сырье*– не более 1 %.

Сырье, изменившее окраску (потемневшее и почерневшее).*Цельное сырье,измельченное сырье* – не более 3 %.

Органическая примесь.*Цельное сырье,измельченное сырье*–не более 1 %.

Минеральная примесь.*Цельное сырье, измельченное сырье*–не более 1 %.

Тяжелые металлыи мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС

«Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье,измельченное сырье:*дубильных веществ в пересчете на танин–не менее 20 %.

Определение дубильных веществпроводятв соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1, из навески 1,0 гсырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм).

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Белены черной листья	**ФС.2.5.0060.18**
Hyoscyami nigri foliae	**Взамен ГФ X ст. 17**

Собранные в течение лета и высушенные прикорневые и стеблевые листья дикорастущего и культивируемого двухлетнего травянистого растения белены черной – *Hyoscyamus niger* L., семейства пасленовых – *Solanaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Цельные или частично измельченные листья продолговато-яйцевидной, яйцевидной или эллиптической формы, перистолопастные или цельные с неравномерно-зубчатым краем. Прикорневые листья с длинным черешком, с обеих сторон покрыты густыми, длинными, мягкими волосками; стеблевые – без черешков, менее опушены, волоски располагаются преимущественно по жилкам и краю пластинки листа. Длина листьев 5 - 20 см, ширина 3 - 10 см. Срединная жилка беловатая, плоская, сильно расширяется к основанию.

Цвет листьев серовато-зеленый. Запах слабый, своеобразный, усиливающийся при увлажнении. Вкус водного извлечения не определяется (сырье ядовито).

Измельченное сырье. Смесь кусочков листьев различной формы, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет серовато-зеленый. Запах слабый, своеобразный, усиливающийся при увлажнении. Вкус водного извлечения не определяется (сырье ядовито).

Микроскопические признаки. *Цельное сырье. Измельченное сырье*.

При рассмотрении листа с поверхности должны быть видны клетки эпидермиса с верхней стороны с мало извилистыми стенками, с нижней – с более извилистыми. Устьица многочисленные с обеих сторон листа, окружены 3 (реже 4) околоустьичными клетками, из которых одна обычно мельче других (анизоцитный тип). Волоски многочисленные, двух типов – простые и головчатые. Простые волоски тонкостенные, одни из них 2 - 3 клеточные, небольшие, другие – многоклеточные, очень крупные. Головчатые волоски с длинной многоклеточной ножкой и 4 – 8 клеточной (изредка 1 – 2 клеточной) железистой головкой. В мезофилле листа содержатся одиночные призматические кристаллы оксалата кальция; нередко встречаются кристаллы в виде крестообразных сростков или тупоконечных друз. В крупных жилках имеются удлиненно-овальные клетки, заполненные кристаллическим песком. В молодых листьях содержатся только мелкие, едва заметные призматические кристаллы, расположенные вблизи жилок.

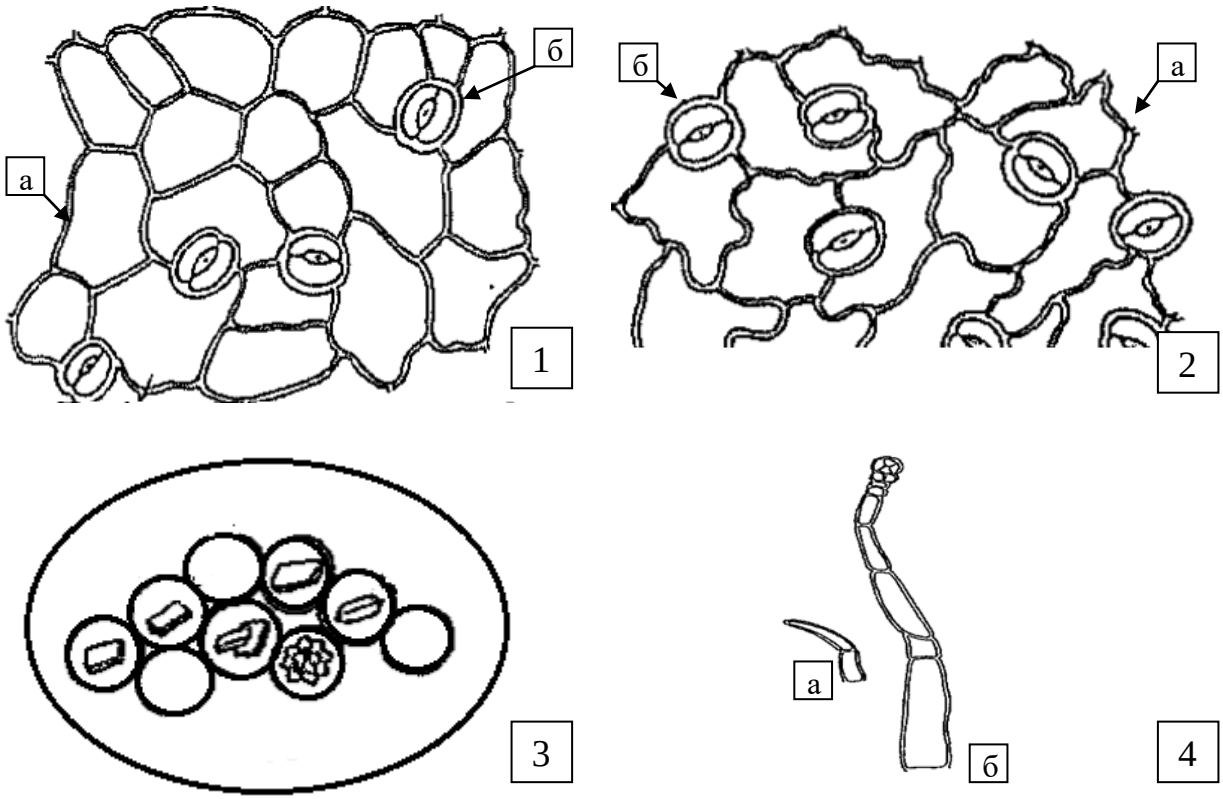


Рисунок - Белены черной листья

1- верхний эпидермис листа: а - клетка эпидермиса, б - устьице анизоцитного типа (280×); 2 - нижний эпидермис листа: а - клетка эпидермиса, б - устьице анизоцитного типа (280×); 3 - паренхима мезофилла листа с призматическими кристаллами и друзами оксалата кальция (280×); 4 - волоски: а - простой, б - железистый (280×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Около 1,0 г сырья измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм помещают в коническую колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 15 мл спирта 90 % и кипятят с обратным холодильником на водяной бане с температурой 80 - 85 °С в течение 1 ч.

10 мл полученного извлечения помещают в колбу вместимостью 50 мл и нагревают на кипящей водяной бане до удаления спирта. К остатку прибавляют 1 мл аммиака концентрированного раствора 25 %, перемешивают, затем прибавляют 10 мл эфира и перемешивают в течение 20 мин. Содержимое колбы переносят в делительную воронку и после разделения фаз отделяют эфирные извлечения. Экстракцию проводят повторно в тех же условиях, используя 10 мл эфира. Объединенные эфирные извлечения фильтруют через бумажный складчатый фильтр с 2,0 г натрия сульфата безводного в круглодонную колбу вместимостью 50 мл. Объединенные эфирные извлечения отгоняют с помощью роторного испарителя при температуре водяной бани около 40 °С досуха. Сухой остаток растворяют в 0,5 мл спирта 96 % (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором наносят 25 мкл (0,025 мл) испытуемого раствора. Пластинку с нанесенной пробой сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 1 ч смесью растворителей ацетон – вода – аммиака концентрированный раствор 25 % (90:7:3), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат на воздухе до удаления следов растворителей, обрабатывают реактивом Драгендорфа, просматривают при дневном свете и фиксируют результаты разделения в течение не более 10 мин.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции от оранжевого до красно-оранжевого цвета на желтом фоне в верхней трети пластинки; допускается обнаружение других зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье. Измельченное сырье* – не более 14 %.

Зола общая. *Цельное сырье. Измельченное сырье* – не более 20 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье. Измельченное сырье* – не более 10 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* измельченных частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, – не более 8 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; измельченных частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

***Листьев, изменивших окраску (пожелтевших, потемневших*).** *Цельное сырье* – не более 3 %.

***Других частей растения (стеблей, цветков, плодов*).** *Цельное сырье* – не более 5 %.

Органической примеси. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1 %.

Минеральной примеси. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье:* суммы алкалоидов в пересчете на гиосциамин – не более 0,05 %.

Сумма алкалоидов в пересчете на гиосциамин

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 10,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 250 мл, приливают 7 мл аммиака раствора концентрированного 25 %, 150 мл эфира и в течение 1 ч смесь энергично взбалтывают. Эфирное извлечение быстро фильтруют через вату в колбу вместимостью 200 мл, прикрывая воронку часовым стеклом. К фильтрату прибавляют 5 мл воды, энергично взбалтывают и оставляют в покое до просветления эфирного слоя; после чего отмеривают с помощью мерного цилиндра 90 мл эфирного извлечения в делительную воронку вместимостью 200 мл. Цилиндр дважды споласкивают эфиром порциями по 10 мл, которые присоединяют к отмеренному эфирному извлечению.

Из эфирного извлечения алкалоиды извлекают последовательно 20, 15, 10 мл хлористоводородной кислоты раствором 1 % до полного их извлечения (проба с реактивом Майера), каждый раз фильтруя через смоченный водой фильтр (диаметром 5 см) во вторую делительную воронку такой же вместимости. Фильтр промывают дважды по 5 мл хлористоводородной кислоты раствором 1 %, присоединяя промывную жидкость к общему кислотному извлечению.

Кислотное извлечение подщелачивают аммиака раствором 10 % до щелочной реакции по фенолфталеину и алкалоиды извлекают последовательно 20, 15, 10 мл хлороформа, взбалтывая по 3 мин. Каждую порцию хлороформного извлечения фильтруют через бумажный фильтр, на который предварительно помещают 4 – 5 г натрия сульфата безводного свежепрокаленного, смоченного хлороформом. Фильтрование производят в колбу для отгонки вместимостью 100 мл. Фильтр промывают хлороформом дважды по 5 мл. Хлороформ отгоняют на водяной бане до 1 -2 мл, остаток хлороформа в колбе удаляют продуванием воздуха до полного исчезновения запаха растворителя. Сухой остаток растворяют в 15 мл 0,02 М раствора хлористоводородной кислоты при нагревании на водяной бане, избыток которой оттитровы-

вают 0,02 М раствором натрия гидроксида до появления желтой окраски (индикатор – метиловый красный).

1 мл 0,02 М раствора хлористоводородной кислоты соответствует 0,005780 г алкалоидов (считая на гиосциамин), которых в белены черной листьях должно быть не более 0,05 %.

Содержание суммы алкалоидов в пересчете на гиосциамин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(15-V_1)\cdot 0{,}005780 \cdot К \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot (100-W)} = \frac{(15-V_1)\cdot 57{,}8 \cdot К}{a \cdot (100-W)}$$

где V_1 – объем 0,02 М раствора натрия гидроксида, пошедшего на титрование, мл;

0, 005780 – количество суммы алкалоидов, соответствующее 1 мл 0,02 М раствора хлористоводородной кислоты, г;

К - поправочный коэффициент к титру 0,02 М раствора натрия гидроксида;

а – навеска сырья, соответствующая отмеренному объему эфирного извлечения, г;

W – влажность сырья, %.

Примечание. В случае завышенного содержания суммы алкалоидов (в пересчете на гиосциамин в %) расчет количества лекарственного растительного сырья, необходимого для производства лекарственного препарата следует проводить по формуле, приведенной в ОФС «Лекарственное растительное сырье. Фармацевтические субстанции растительного происхождения».

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Березы листья **ФС.2.5.0005.15**

Betulaefolia

Собранные в период вегетации (июнь–июль) и высушенные листья дикорастущих деревьев березы повислой (березы бородавчатой) – *Betula pendula* Roth. (*Betula verrucosa* Ehrh.) и березы пушистой – *Betula pubescens* Ehrh., сем.березовых – *Betulaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки.*Цельное сырье.* Цельные или частично измельченные листья, простые, черешковые, без прилистников. Листовые пластины ромбические, треугольные или треугольно-яйцевидные по форме, длиной от 3,0 до 6,5 см, шириной от 2,0 до 5,5 см. Верхушка листа заостренная, основание клиновидное, округлое. Край листовой пластинки дважды остропильчатый. Жилкование перистое. Листовая пластинка слабо опушенная по всей поверхности с обеих сторон (*B. pubescens*) или почти голая, с редкими волосками по краю ближе к верхушке и по жилкам с нижней стороны (*B. pendula*), золотисто-желтые блестящие железки по всей поверхности с обеих сторон листовой пластинки и на черешке.Цвет листьев с верхней стороны – зеленый, коричневато-зеленый, с нижней стороны –светло-зеленый, серо-зеленый, светлый коричневато-зеленый.

Запахслабый, характерный. Вкус водного извлечения горьковатый.

Измельченное сырье. Кусочки листовых пластинок различной формы и черешков, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 5 мм.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки листовых пластинок с мелкопильчатозубчатым или удвоеннопильчатозубчатым краем, с редкими волосками с обеих сторон (*B. pubescens*) или голые (*B. pendula*), с золотисто-желтыми блестящими железками по всей поверхности с обеих сторон; кусочки черешков, редко – веточек с желтовато-белой древесиной и коричневой корой.

Цвет измельченного сырья от зеленого до коричневато-зеленого со светло-зелеными, серо-зелеными и редкими желтовато-коричневыми, желтовато-белыми или коричневыми вкраплениями.

Запах слабый, характерный. Вкус водного извлечения горьковатый.

Порошок. Кусочки листовых пластинок различной формы и черешков, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки листовых пластинок с мелкопильчатозубчатым или удвоеннопильчатозубчатым краем, с редкими волосками с обеих сторон (*B. pubescens*) или голые (*B. pendula*), с золотисто-желтыми блестящими железками по всей поверхности с обеих сторон; кусочки черешков, редко – веточек с желтовато-белой древесиной и коричневой корой.

Цвет порошка от зеленого до коричневато-зеленого со светло-зелеными, серо-зелеными и редкими желтовато-коричневыми, желтовато-белыми или коричневыми вкраплениями.

Запах слабый, характерный. Вкус водного извлечения горьковатый.

Микроскопические признаки.*Цельное, измельченное сырье и порошок.* При рассмотрении листа с поверхности должны быть видны клетки эпидермиса верхней стороны листа, состоящие из клеток правильной 4–6-угольной формы с ровными стенками. Клетки эпидермиса нижней стороны листовой пластинки в очертании более извилистые, по размерам сравнимы с клетками верхнего эпидермиса или несколько мельче. Устьица аномоцитного типа. Околоустьичных клеток 4–8, чаще 6. Устьица расположены преимущественно с нижней стороны листовой пластинки. На поперечном

срезе должен быть виден двух-, трехслойныйстолбчатый мезофилл. В обкладочной паренхиме жилок листовой пластинки локализованы крупные ромбической формы кристаллы и мелкие друзы.

На эпидермисе должны быть видны крупные щитковидные железки, расположенные с обеих сторон листа, чаще по жилкам. Железки с крупными бесцветными головками. Головки состоят из большого количества клеток и расположены лучами от центра. Кутикула над головкой мощная, чешуйчатая, нередко отслаивается, обнажая клетки, формирующие головку трихомы. Клетки ножки железок, как правило, окрашены пигментом темно-коричневого цвета. Кутикула обусловливает глянцевую, слегка шершавую поверхность листа. По жилкам и по краю листовой пластинки встречаются простые одноклеточные волоски с толстыми стенками, расширенным основанием и заостренной верхушкой. Вблизи жилок видны друзы оксалата кальция. Щитковидные железки характерного строения и редкие мелкие волоски видны на эпидермисе черешка листа.

При рассмотрении микропрепаратов порошка должны быть видны фрагменты: эпидермисаверхней стороны листа, состоящего из клеток правильной 4–6-угольной формы; эпидермиса нижней стороны листа с извилистыми стенками клеток;эпидермиса листа с округлыми устьицамианомоцитного типа;жилок с крупными кристаллами ромбической формы и мелкими друзами в обкладочной паренхиме;эпидермиса листа с крупными щитковидными железкам; жилок и края листа с простыми одноклеточными волосками с толстыми стенками, расширенным основанием и заостренной верхушкой; эпидермиса черешка с щитковидными железками и мелкими простыми волосками; а также отдельные отпавшие щитковидные железки и простые волоски.

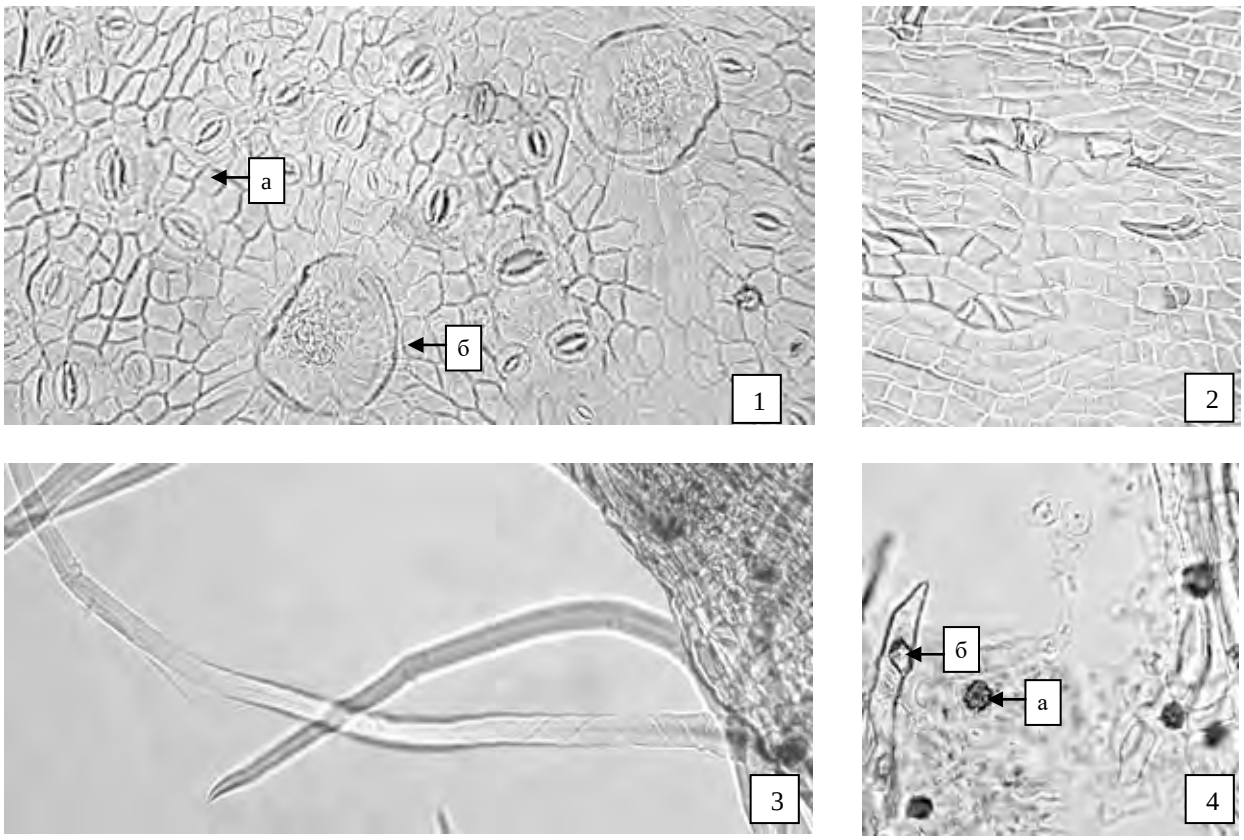


Рисунок – Березы листья.
1 – фрагмент эпидермиса нижней стороны листа: а– устьицааномоцитного типа, б– железка (200×); 2 – фрагмент эпидермиса, черешка с мелким простым волоском (200×); 3 – простые толстостенные волоски (200×);
4 – друзы (а) и призматические кристаллы (б) оксалата кальция (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Около 1,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещают в колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 10 мл спирта 40 % и нагревают с обратным холодильником при умеренном кипении на электроплитке с закрытой спиралью в течение 15 мин. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр с красной полосой (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором наносят 6 мкл испытуемого раствора и 10 мкл раствора стандартного образца(СО) гиперозида (см. раздел «Количественное определение» приготовление раствора А СО гиперозида).

Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 1 ч смесью растворителей хлороформ – спирт 96 % – вода (26:16:3), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм.

На хроматограмме раствора СО гиперозида должна обнаруживаться зона адсорбции темно-коричневого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться доминирующая зона адсорбции темно-коричневого цвета на уровне зоны адсорбции СО гиперозида;допускается обнаружение других зон адсорбции.

Пластинкуобрабатывают свежеприготовленным диазореактивом, помещают в сушильный шкаф, выдерживают при температуре 105-110 °С в течение 5 мин и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО гиперозида должна обнаруживаться зона адсорбции желтовато-оранжевого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должнаобнаруживаться доминирующая зона адсорбции желтовато-оранжевого цвета на уровне зоны адсорбции СО гиперозида; допускается обнаружение других зон адсорбции (флавоноиды).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность.*Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* – не более 12 %.

Зола общая. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* – не более 7 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте.*Цельное сырье,измельченное сырье, порошок* – не более 2 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, – не более 5 %. *Измельченное*

*сырье:*частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм, –не более

5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, –не более 5 %. *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, –не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, –не более 5 %.

Посторонние примеси

Другие части растения (ветки, части соцветий)*.Цельное сырье,измельченное сырье* –не более 5 %.

Сырье, изменившее окраску (потемневшие и почерневшее). *Цельное сырье, измельченное сырье* –не более 5 %.

Органическая примесь*.Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1 %.

Минеральная примесь*.Цельное сырье, измельченное сырье,порошок* – не более 1 %.

Тяжелые металлыи мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение.*Цельное сырье,измельченное сырье,порошок:* содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид – не менее 1,5 %.

Приготовление растворов.

Раствор СО гиперозида. Около 0,02 г (точная навеска) СО гиперозида растворяют в мерной колбе вместимостью 50 мл в 35 мл спирта 70 % при периодическом помешивании, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор А СО гиперозида).

1,0 мл раствора А СО гиперозида помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл прибавляют 1 мл алюминия хлорида раствора 2 % в спирте 96 %и 1 каплюуксусной кислоты разведенной 30 %, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б СО гиперозида).

Срок годности растворов 30 сут.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм.Около 1,0г (точная навеска)измельченного сырья помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл с притертой пробкой, прибавляют 100 мл спирта 50 % и взвешивают с точностью ± 0,01 г. Колбу с содержимым присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане в течение 2 ч. После охлаждения до комнатной температуры колбу взвешивают, доводят ее содержимое спиртом 50 % до первоначальной массы, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр (раствор А испытуемого раствора).

1,0 мл раствора А испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 1 мл алюминия хлорида раствора 2 % в спирте 96 %и 1 каплю уксусной кислоты разведенной 30 %, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора).

Оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора измеряют через 30 мин на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.В качестве раствора сравнения используют раствор состоящий из1 мл раствора А испытуемого раствора, 1 капли уксусной кислоты разведенной30 %,доведенный спиртом 96 %до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО гиперозида в тех же условиях. В качестве раствора сравнения используютраствор состоящий из 1 мл раствора А СО гиперозида,1 капли уксусной кислоты разведенной 30 %,доведенный спиртом 96 %до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид и абсолютно сухое сырье в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 25 \cdot P \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot 50 \cdot 25 \cdot a \cdot 1 \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot a_0 \cdot P \cdot 200}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где*A* – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;

$A_о$ – оптическая плотность раствора Б СО гиперозида;

$a_о$– навеска СО гиперозида, г;

a – навеска сырья, г;

P–содержание основного вещества в СО гиперозида, %;

W – влажность сырья, %.

Допускается содержание суммы флавоноидов вычислять с использованием удельного показателя поглощения комплексагиперозида с алюминия хлоридом по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1см}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 250000}{A_{1см}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где*A* – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;

$A_{1см}^{1\%}$– удельный показатель поглощения комплекса гиперозида с алюминия хлоридом при длине волны 410 нм, равный 380.

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %;

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Березы почки **ФС.2.5.0006.15**

Betulae gemmae

Собранные до распускания в зимне-весенний период (январе – апреле) и высушенные листовые почки дикорастущих деревьев березы повислой (березы бородавчатой) –*Betula pendula* Roth. (*Betula verrucosa* Ehrh.) и березы пушистой – *Betula pubescens* Ehrh.*,* сем.березовых –*Betulaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки.*Цельное сырье.* Почки удлиненно-конические, заостренные или притупленные, часто клейкие. Почечные чешуи расположены черепицеобразно, плотно прижаты по краям, слегка реснитчатые (нижние короче верхних и иногда с несколько отстающими кончиками); длина почек 3–7 мм, в поперечнике – 1,5–3 мм. Цвет почек коричневый, у основания иногда зеленоватый.

Запах характерный. Вкус водного извлечения слегка вяжущий, смолистый.

Микроскопические признаки*. Цельное сырье.* При рассмотрении поперечных срезов почки должно быть видно полуобъемлющее по типу почкосложение. В центре видны крупные зачатки 2 –3 листьев. Характер листосложения – складчатый. Между фрагментами крупных складчатых чешуй локализованы поперечные сечения мелких, не складчатых, ровной формы, сложенных пополам фрагментов зачатков листьев. На срезах в базальной части, рядом с основанием почки, складчатые фрагменты зачатков листьев отсутствуют. В центре поперечного среза базальной части почки заметны фрагменты 2 черешков. Поперечные сечения черешков округлые с

углублением в верхней части. Проводящие элементы черешка представлены одним закрытым коллатеральным пучком С-образной формы.

Поверхность зачатков листьев, их черешков и кроющих чешуй опушена щитковидными железками. Головки железок многоклеточные округлые 8-, 9-клеточные. Клетки головки тонкостенные, прозрачные, с каплями эфирного масла. Ножка железки крупная, многоклеточная, состоит из овальных или слегка вытянутых клеток, заполненных коричневым содержимым.

Помимо щитковидных железок на поверхности зачатков листьев имеются простые одноклеточные бичевидные волоски с сильно утолщенной, иногда лигнифицированной клеточной стенкой. Протопласт бичевидных волосков аморфный, коричневого или темно-желтого цвета.

Кроющие чешуи почек опушены слабее. На поперечных срезах кроющих чешуй должны быть видны простые бичевидные волоски, локализованные по краю. Железкиконусовидной формы на кроющих чешуях локализованы у их основания. Клетки, составляющие головку конусовидных железок, образуют головку от самого основания трихомы. Ножка железки на продольном срезе –треугольнойформы и состоит из мелких, слегка вытянутых клеток, заполненных коричневым содержимым.

Мезофилл зачатков листьев на поперечном срезе однороден и представлен тонкостенными клетками округлой, иногда продолговатой формы, с зернистым протопластом желто–зеленого цвета. Эпидермис зачатков листьев тонкостенный, слабо кутинизированный. Непосредственно под эпидермой в мезофилле локализованы многочисленные друзы и кристаллы оксалата кальция. В мезофилле зачатков листьев, ближе к базальной части почки, имеются многочисленные проводящие пучки коллатерального типа. Проводящие элементы ксилемы на поперечном срезе имеют многоугольную форму, их стенки лигнифицированы.

Эпидермис чешуй с внешней стороны сильно кутинизирован. Полости клеток пигментированы. Под эпидермисом локализован блок пластинчатой

колленхимы. На внешней и внутренней поверхностях почечных чешуй, в эпидермисе, изредка встречаются сформированные чечевички. Этот признак характерен особенно для краевых чешуй. Мезофилл кроющих чешуй состоит из более крупных, чем у зачатков листьев, округлых клеток. Протопласт клеток мезофилла пигментирован. Характер пигментации зависит от локализации чешуй. В мезофилле краевых чешуй пигментация сильнее. Мезофилл внутренних чешуй практически не пигментирован.

Проводящие пучки кроющих чешуй мелкие, с малым количеством проводящих элементов.

При рассмотрении чешуи почки с поверхности должно быть видно, что клетки эпидермиса наружной стороны чешуи более толстостенные, чем внутренней, стенки клеток эпидермиса наружной стороны чешуи утолщаются по направлению от основания к верхушке и краям чешуи.

На верхушке и по краю чешуй эпидермис опушен простыми одноклеточными волосками; по краю они более толстостенные и значительной длины. Устьица располагаются с наружной стороны чешуй. Сквозь эпидермис внутренней стороны просвечивают узкие проводящие пучки со спиральными элементами ксилемы и многочисленные мелкие друзы. У внутренних чешуй стенки клеток эпидермиса утолщены только в нижней части чешуи.

На зубцах края зачатков листьев локализованы крупные конусообразные железки, аналогичные описанным ранее для кроющих чешуй. Поверхность зачатков листьев густо опушена многочисленными крупными железками коричневого цвета в различных стадиях развития.

С нижней стороны эпидермиса листового зачатка наблюдаются устьица. По жилкам зачатка листьев и его краям, особенно у основания листочков, расположены простые одноклеточные бичевидные волоски, аналогичные волоскам чешуй. Сквозь эпидермис просвечивают друзы оксалата кальция.

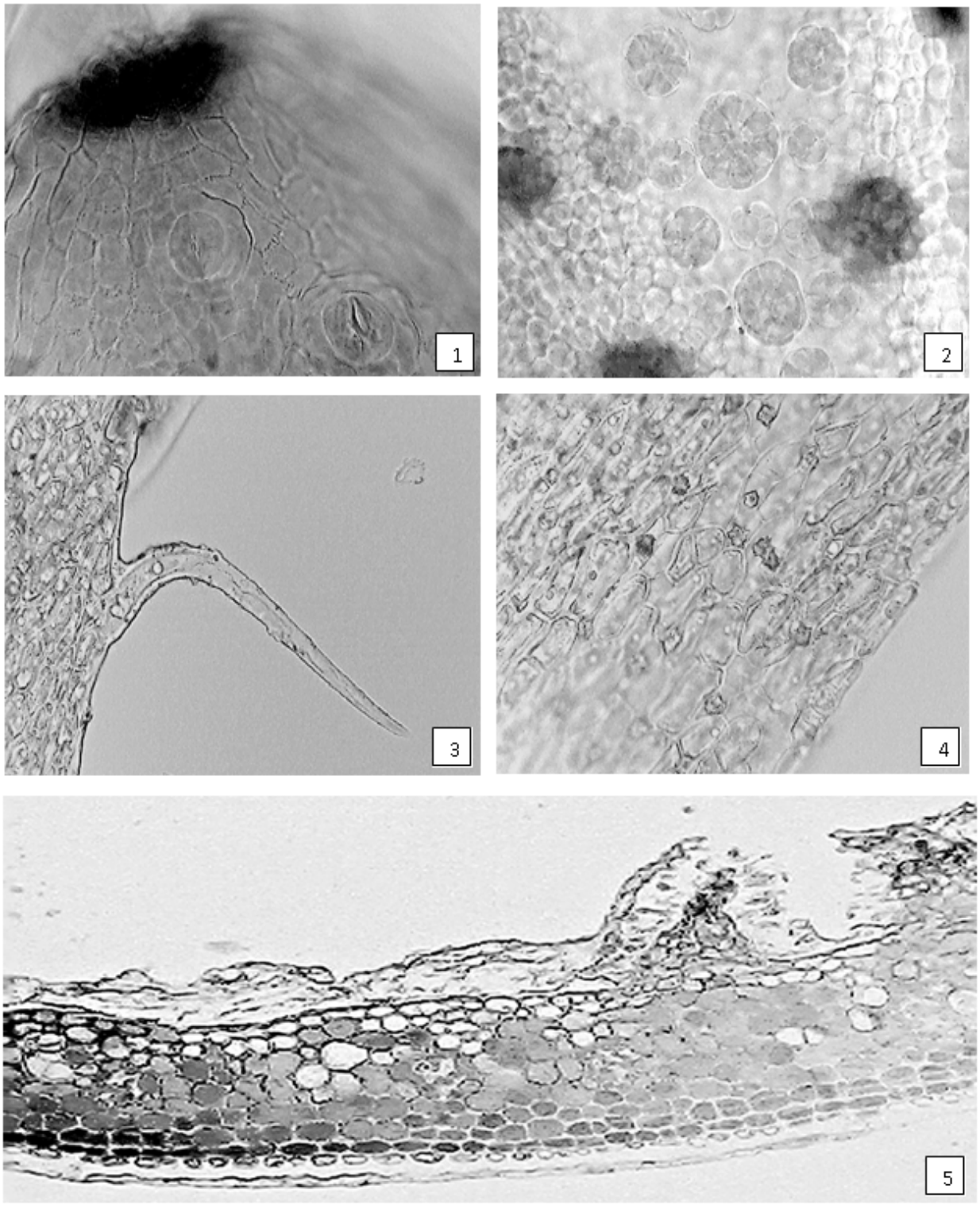


Рисунок – Березы почки.
1 – фрагмент эпидермиса кроющей чешуи с устьицами (400×); 2 – фрагмент эпидермиса с железками (400×); 3 – простой бичевидный волосок; 4 – друзы оксалата кальция; 5 – фрагмент поперечного среза кроющей чешуи с конусовидной железкой (400×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) суданакрасного G. Около 0,0025 г СО судана красного Gрастворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора 6 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около 0,5 г сырья измельченного до отсутствия цельных почекпомещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл спирта 70 % и нагревают с обратным холодильником на водяной бане в течение 15 мин. Колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры, после чего ее выдерживают в морозильной камере при температуре минус 18 ºС в течение не менее 1 ч. Содержимое колбы быстро фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки наносят 10 мкл испытуемого раствора и 3 мкл раствора СО судана красного G.

Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 30 мин смесью растворителей толуол – этилацетат – муравьиная кислота безводная (95:5:2), и хроматографируют восходящим способом.После того как фронт растворителей пройдет 80–90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей.

Пластинку обрабатывают анисового альдегида раствором уксуснокислым в этаноле,выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100 – 105 ºС в течение 2 – 3 мин и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО судана красного G должна обнаруживаться зона адсорбции розового, розово-фиолетового или фиолетового цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться 4 зоны адсорбции фиолетового, сине-фиолетового или серо-фиолетового цвета ниже зоны адсорбции СО судана красного G, зона адсорбции розового,

розово-фиолетового или фиолетового цвета на уровне зоны адсорбции судана красного G, одна зона адсорбции фиолетового, сине-фиолетового или серо-фиолетового цвета чуть выше зоны адсорбции судана красного G; допускается обнаружение других зон адсорбции (терпеноиды).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье*– не более 10 %.

Зола общая.*Цельное сырье*–не более 4 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте.*Цельное сырье*– не более 0,7 %.

Посторонние примеси

Другие части березы (веточки, в том числе отделенные от почек при анализе, сережки и пр.).*Цельное сырье*–не более 8 %.

Почки, тронувшиеся в рост и распустившиеся.*Цельное сырье*– не более 2 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье*–не более 1 %.

Минеральная примесь.*Цельное сырье*–не более 0,5 %.

Тяжелые металлыи мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье:* сумма флавоноидов в пересчете на лютеолин – не менее 2,5 %; эфирного масла –не менее 0,2 %.

Сумма флавоноидов

Приготовление растворов.

РастворСО лютеолина. Около 0,02 г (точная навеска) СО лютеолина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 35 мл спирта 96 % и растворяют при нагревании (70–80 °С). Содержимое колбы охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и тщательно перемешивают (раствор А СО лютеолина). Срок годности раствора 30 сут.

1,0 мл раствора А СО лютеолина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл,прибавляют 2 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 % и 1 каплю уксусной кислоты разведенной 30 %, доводят объем спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б СО лютеолина). Срок годности раствора 30 сут.

Аналитическую пробу сырья измельчают до отсутствия цельных почек. Около 1,0 г(точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу с притертой пробкой вместимостью 100 мл и прибавляют 40 мл спирта 70 %. Колбу закрывают пробкой, взвешивают с погрешностью±0,01 г, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане в течение 1 ч. Содержимое колбы охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и доводят спиртом 70 % до первоначальноймассы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр с красной полосой, отбрасывая первые 10 мл. 5,0 мл фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствора Аиспытуемого раствора).

1,0 мл раствора Аиспытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл,прибавляют 2 мл алюминия хлорида раствора 2 % в спирте 96 % и 1 каплю уксусной кислоты разведенной 30 %, доводят объем спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора).

Оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора измеряют через 30 мин на спектрофотометре при длине волны 400 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.В качестве раствора сравнения используютраствор состоящий из 1 мл раствора Аиспытуемого раствора и 1 капли уксусной кислоты разведенной 30 %, доведенный спиртом 96 %до метки в мерной

колбе вместимостью 50 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО лютеолина в тех же условиях. В качестве раствора сравнения используютраствор состоящийиз 1 мл раствора А СО лютеолина, 1 капли уксусной кислоты разведенной 30 %, доведенный спиртом 96 %до метки в мерной колбе вместимостью 50 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин и абсолютносухое сырье в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 40 \cdot 25 \cdot 50 \cdot a_0 \cdot 1 \cdot P \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 5 \cdot 1 \cdot 50 \cdot 50 \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot a_0 \cdot P \cdot 400}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где*A*– оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;

A_o–оптическая плотность раствора Б СО лютеолина;

a– навеска сырья, г;

a_o– навеска СО лютеолина, г;

P – содержание основного вещества в СО лютеолина, %;

W–влажность сырья, %.

Допускается содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин вычислять с использованием удельного показателя поглощения комплекса лютеолина с алюминия хлоридом по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 40 \cdot 25 \cdot 50 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 5 \cdot 1 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 1000000}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где*A* – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;

$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощениякомплекса лютеолина с алюминия хлоридом при длине волны 400 нм, равный 410;

a– навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Эфирное масло

В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания

эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1; навеска 10,0 или 20,0 г сырья, измельченного до отсутствия цельных почек,время перегонки 2 ч).

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Бессмертника песчаного цветки **ФС.2.5.0007.15**

Helichrysi arenarii flores

Собранные до распускания цветков и высушенные корзинки дикорастущего многолетнего травянистого растения бессмертника (цмина) песчаного –*Helichrysum arenarium* (L.)Moench, сем. астровых –*Asteraceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки.*Цельное сырье.*Щитковидные соцветия, состоящие из 20 – 35 мелких корзинок, или части этих соцветий, иногда отдельные корзинки и цветки. Корзинки по форме шарообразные или слабо-вытянутые, одиночные или по несколько вместе, диаметром 4-7 мм каждая, с остатками беловойлочных цветоносов (осевых частей соцветия) длиной не более 1 см. Цветки расположены наголом цветоложе и окружены многочисленными неплотно прижатыми листочками обвертки. Все цветки в корзинке трубчатые обоеполые, с хохолком; отгибы венчика пятизубчатые. Обвертка корзинки 3-4-рядная состоит из черепитчато-расположенных, лепестковидных, неплотно прижатых, выпуклых листочков лимонно-желтого цвета. Листочки обвертки сухие, пленчатые, блестящие, неоднородные по форме: наружные – широко ланцетовидные; внутренние – линейные. Все листочки обвертки с пленчатым краем и коричневатой или зеленовато-серойполоской посередине. Цветоложе корзинок плоское или слегка выпуклое, мелко-ямчатое. Цветки корзинки, как правило, морфологически различимы и разделяются на срединные и краевые.

Краевые цветки немногочисленные (обычно 5 - 7) пестичные или обоеполые, с длинной узкой трубкой околоцветника; венчики по форме нитевидные, пятизубчатые, лимонно-желтого цвета.

Срединные цветки многочисленные, мелкие, в 1,5 – 2 раза мельче краевых; обоеполые, трубки их венчиков 5-зубчатые и с 3 – 4 дополнительными менее выраженными зубцами, обычно желтые или оранжевые.

Цвет листочков обвертки лимонно-желтый, иногда с красновато-оранжевыми верхушками, венчиков цветков – лимонно-желтый или оранжевый; цветоносов и листьев – серый, зеленовато- или коричневато-серый.

Запах слабый, характерный.Вкус водного извлечения пряно-горький.

Измельченное сырье. Корзинки одиночные, редко по 2– 3 вместе, шаровидные, отдельные цветоложа и их кусочки с остатками или цельными листочками обвертки, отдельные листочки обвертки, трубчатые цветки и их части, кусочки цветоносов, листьев и стеблей, размером до 10 мм.

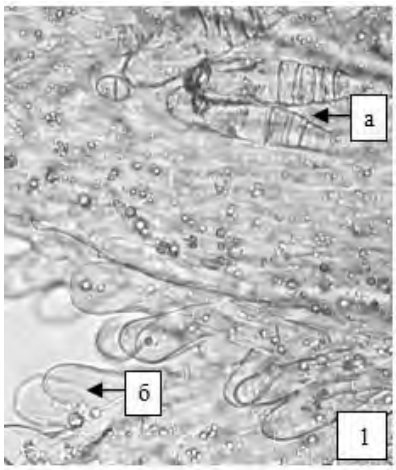
При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны цельные корзинки, отдельные мелкоямчатые цветоложа или их кусочки зеленовато-коричневого цвета; цветоложа с остатками или цельными листочками обвертки; отдельные пленчатые листочки обвертки лимонно-желтого цвета с коричневатой или зеленовато-серой полосой по центру в нижней части; трубчатые цветки с пятизубчатым венчиком желтого или оранжевого цвета, как правило, без хохолка и завязи; белесые кусочки многоклеточных волосков хохолка, отдельные завязи коричневого цвета; кусочки опушенных цветоносов, листьев и стеблей беловато- или зеленовато-серого, редко серовато-коричневого цвета; кусочки цветоносов, листьев и стеблей почти голые (волоски удалены при измельчении) от темно-коричневого до зеленовато-коричневого цвета; редко встречаются продольно-расщепленные кусочки стеблей с белесой сердцевиной.

Цвет серовато-желтый с лимонно-желтыми, оранжевыми, беловато- или зеленовато-серыми, редко серовато-коричневыми, темно-коричневыми и зеленовато-коричневыми вкраплениями.

Запах слабый, характерный. Вкус водного извлечения пряно-горький.

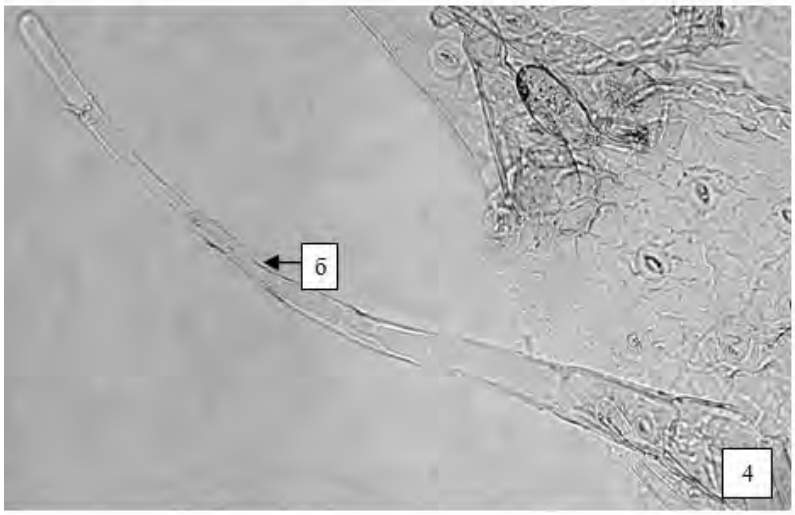
Микроскопические признаки. *Цельное сырье, измельченное сырье*. При рассмотрении микропрепаратов с поверхности должны быть видны: листочки обвертки, мезофилл которых состоит из клеток с утолщенными пористыми стенками, в суженной части листочка – многочисленные простые бичевидные волоски, состоящие из нескольких коротких клеток основания и одной длинной конечной клетки; эфирномасличные железки, овальные, двухрядные, многоярусные, состоящие из 8 – 12 клеток; слегка вытянутые клетки эпидермиса с устьицами аномоцитного типа;по центру листочка, в мезофилле, видны многочисленные короткие трахеиды проводящего пучка; отдельные цветки, у которых видна овальная завязь, сплошь покрытая крючкообразно-загнутыми волосками, в основании завязи – кольцо из четырехугольных клеток с утолщенными одревесневшими оболочками, на верхушке завязи кольцом расположен хохолок, состоящий из длинных многоклеточных волосков, сросшихся у основания, хохолок часто отломан и встречаются только отдельные волоски или их фрагменты;венчик пятизубчатый трубчатый, клетки эпидермиса внутренней стороны зубцов с сосочковидными выростами и складчатой кутикулой, наружной стороны – с многочисленными железками характерного строения; пыльники пленчатые в количестве 5, пестик с двухлопастным рыльцем; пыльца округлая и округло-трехгранная шиповатая трехпороваяс шиповатой экзиной; фрагменты цветоложа незрелого соцветия с многочисленными зачатками трубчатых цветков с железками и волосками хохолка; фрагменты цветоложа зрелого соцветия с многочисленными ответвлениями проводящих пучков, окруженные кольцом округло-многоугольных клеток с утолщенными одревесневшими оболочками (места прикрепления завязей трубчатых цветков); фрагменты листа, клетки эпидермиса которого с нижней стороны с извилистыми, с верхней – с почти прямыми стенками, устьица аномоцитного типа с обеих сторон листа, многочисленные волоски, состоящие из крупного многоклеточного основания и длинной конечной шнуровидной клетки с

расширенным основанием, железки характерного строения, более многочисленные с нижней стороны листа; фрагменты цветоносов и стеблей, эпидермис которых состоит из продольно-вытянутых клеток и сплошь покрыт волосками характерного строения, встречаются железки и устьица; в сердцевине стебля, среди удлиненно-прямоугольных клеток паренхимы,расположены сосудистые пучки, представленные сетчато-лестничными, лестничными и спиральными сосудами.









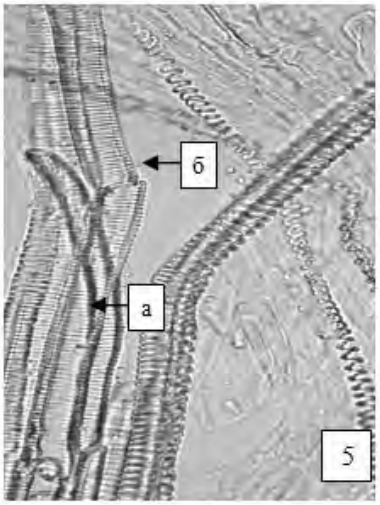




Рисунок – Бессмертника песчаного цветки.
1 – фрагмент эпидермиса лепестка венчика: а – эфирномасличные железки, б – сосочковидные выросты (200×); 2 – фрагмент завязи: а – крючкообразно-загнутые волоски, б – кольцо механических клеток (200×);3 – волоски хохолка (200×); 4 – фрагмент эпидермиса листа: а– устьица аномоцитного типа, б – простой многоклеточный волосок (100×);5 – лестничные (а) и спиральные (б) сосуды (200×);6 – фрагмент эпидермиса листа с бичевиднымиволосками (100×).

Определение основных биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

*Раствор стандартного образца (СО) лютеолин-7-глюкозида.*Около 0,01 г СО лютеолин-7-глюкозида растворяютв 10 млспирта 70 % при нагревании. Срок годности раствора 3 мес.

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 20 мкл испытуемогораствора(см. раздел «Количественное определение» приготовление раствора А испытуемого раствора) и 10 мкл раствора СО лютеолин-7-глюкозида. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 2 ч смесью растворителей хлороформ – спирт96 %–вода (26:16:3), и хроматографируют восходящим способом.

Когда фронт растворителей пройдет около 80–90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителейи просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО лютеолин-7-глюкозида должна обнаруживаться зона адсорбции светло-желтого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции светло-желтого цвета на уровне или выше уровня зоны адсорбции СО лютеолин-7-глюкозида; допускается обнаружение других зонадсорбции.

Затем хроматограмму просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм.

На хроматограмме раствора СО лютеолин-7-глюкозида должна

обнаруживаться доминирующая темная зона адсорбции.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться темная зона адсорбции на уровне или выше уровня зоны адсорбции СО лютеолин-7-глюкозида; допускается обнаружение других зонадсорбции.

Далее пластинку обрабатывали диазореактивом, нагревают при 100 – 105 °С и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО лютеолин-7-глюкозида зона адсорбциисветло-желтого цвета приобретает оранжевую окраску.

На хроматограмме испытуемого раствора зона адсорбции светло-желтого цвета на уровне или выше уровня зоны адсорбции СО лютеолин-7-глюкозида приобретает оранжевую окраску; допускается обнаружение других зонадсорбции (флавоноиды).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность.*Цельное сырье,измельченное сырье* –не более 12 %.

Зола общая. *Цельное сырье,измельченное сырье* – не более 8 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье,измельченное сырье* –не более 4 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* измельченных частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье*: частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм,– не более 5 %.

Посторонние примеси

Кусочки стеблей и цветоносов.*Цельное сырье,измельченное сырье*- не более 10 %.

Соцветия с остатками стеблей длиной свыше 1 см. *Цельное сырье* – не более 5 %.

Остатки корзинок (цветолож с обвертками).*Цельное сырье* –не более 5 %.

Сырье, изменившее окраску (потемневшее и почерневшее).*Цельное*

сырье, измельченное сырье –не более 3 %.

Органическая примесь.*Цельное сырье,измельченное сырье* –не более 0,5 %.

Минеральная примесь.*Цельное сырье, измельченное сырье* –не более 0,5 %.

Тяжелые металлыи мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение.*Цельное сырье, измельченное сырье:* сумма флавоноидов в пересчете на изосалипурпозид–не менее 3 %.

Приготовление растворов.

Раствор СО изосалипурпозида. Около 0,025 г (точная навеска) СО изосалипурпозида растворяют в небольшом количестве спирта 96 % в мерной колбе вместимостью 25 мл, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор АСОизосалипурпозида).

1,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б СО изосалипурпозида).

Срок годности растворовне более 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

1,0 мл раствора АСО изосалипурпозидапомещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляют 2 мл алюминия хлорида раствора 2 % в спирте 96 % и 1 каплю уксусной кислоты разведенной 30 %, доводят объём раствора спиртом 96 % (раствор В СО изосалипурпозида). Раствор используют свежеприготовленным.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц,

проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу с притертой пробкой вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл спирта 70 % и взвешивают с точностью ± 0,01 г, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане в течение 1 ч. Затем содержимое колбы охлаждают, доводят при необходимости содержимое колбы до первоначальноймассы, фильтруют через бумажный фильтр с красной полосой (раствор А испытуемого раствора).

1,0 мл раствора Аиспытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 2 мл алюминия хлорида раствора 2 % в спирте 96 % и 1 каплю уксусной кислоты разведенной 30 %, доводят объём раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора).

Оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора измеряют через 30 мин на спектрофотометре при длине волны 418 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из1 мл раствораА испытуемого раствора, 1 каплиуксусной кислоты разведенной 30 %, доведенный спиртом 96 %до метки в мерной колбе вместимостью 50 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора В СО изосалипурпозида. В качестве раствора сравнения используют раствор Б СО изосалипурпозида.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на изосалипурпозид в абсолютно сухом сырье в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 50 \cdot 50 \cdot 100 \cdot 100 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot 1 \cdot 25 \cdot 25 \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot a_0 \cdot P \cdot 400}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
A_o– оптическая плотность раствора В СО изосалипурпозида;
a– навеска сырья, г;

a_o– навеска СО изосалипурпозида, г;
P – содержание основного вещества в СОизосалипурпозида, %;
W– влажность сырья, %.

Допускается содержание суммы флавоноидов в пересчете на изосалипурпозидвычислятьс использованием удельного показателя поглощения комплексаизосалипурпозида с алюминия хлоридомпо формуле:

$$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 50 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 25000}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где*A*–оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса изосалипурпозида с алюминия хлоридом при длине волны 418 нм, равный 500;
a – навеска сырья, г;
W–влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Боярышника плоды	**ФС.2.5.0061.18**
Crataegi fructus	**Взамен ГФ XI ст. 32 (изм. № 3 от 10.02.1999)**

Собранные в фазу полного созревания и высушенные плоды дикорастущих и культивируемых кустарников или небольших деревьев различных видов боярышника *(Crataegus)*: боярышника сглаженного – *C. laevigata (Poir.) DC*. (боярышника колючего – C. oxyacantha sensu Pojark.), боярышника Королькова – *C. korolkovii L., Henry*, боярышника желтого – *C. chlorocarpa Lenne et C. koch* (боярышника алтайского – *C. altaica (Lond.) Lange*), боярышника даурского - *C. dahurica Koehne ex Schneid.,* боярышника однопестичного - *C. monogina Jacq.,* боярышника германского – *C. alemanniensis Cin.,* боярышника пятипестичного – *C. pentagyna Waldst. et Kit.,* боярышника восточно-балтийского – *C. orientobaltica Cin.,* боярышника отогнуточашелистикового – *C. curvisepala Lindm*., боярышника курземского – *C. x curonica Cin.,* боярышника даугавского – *C. x dunensis Cin*., сем. розоцветные – *Rosaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Плоды яблокообразные, от шаровидной до эллипсоидальной формы, твердые, морщинистые, длиной 6 - 14 мм, шириной 5 - 11 мм, сверху с кольцевой оторочкой, образованной ссохшимися чашелистиками. В мякоти плода находятся 1 - 5 деревянистых косточек, имеющих неправильную треугольную, овальную или сжатую с боков форму. Поверхность косточек ямчато-морщинистая или бороздчатая по спинке. Цвет плодов от желто-оранжевого и коричневато-красного до темно-коричневого или черного, иногда с беловатым налетом выкристаллизовавшегося сахара. Запах отсутствует. Вкус водного

извлечения сладковатый.

Отличительные признаки плодов боярышника различных видов приведены в таблице.

Порошок. Смесь частиц околоплодника и косточек плодов, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Цвет от желто-оранжевого и коричневато-красного до коричневого с черными и коричневатыми вкраплениями, иногда с беловатым налетом выкристаллизовавшегося сахара. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения сладковатый.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении микропрепаратов эпидермиса плода с поверхности должны быть видны 4 - 6-угольные клетки с равномерно утолщенными стенками и желто-коричневым содержимым; редкие одиночные одноклеточные, слегка извилистые, на концах заостренные, толстостенные волоски. На кусочках оторочки плода должны быть многочисленные одноклеточные волоски со вздутиями, притупленные у верхушки и расширенные у основания, с тонкими стенками и коричневатым содержимым. Мякоть плода должна состоять из клеток округлой или овальной формы, содержащих хромопласты оранжево-красного или коричневато-желтого цвета, мелкие друзы и призматические кристаллы оксалата кальция. В мякоти плода проходят пучки, одиночные склереиды, рядом с крупными пучками расположены группы каменистых клеток или одиночные каменистые клетки; кристаллы оксалата кальция местами образуют кристаллоносную обкладку.

Характеристика плодов боярышника

Вид боярышника	Форма плода	Цвет плода	Чашелистики	Размер плода, мм		Цвет мякоти плода	Количество косточек	Форма косточек	Размер косточек, мм	
				длина	ширина				дли-на	ширина
Кроваво-красный	Почти шаровидная или коротко-эллипсоидальная	Темно-красный (коричневато-красный)	Продолговато-треугольные, цельные или с 1-2 зубцами с каждой стороны	От 7 до 10	От 7 до 9	Желтоватый	(2) 3-4 (5)	Неправильная треугольная, с боков ямчатая	От 5 до 6	От 3 до 4
Сглаженный	Почти шаровидная или коротко-эллипсоидальная	Коричневато-красный, коричневый или черный	Широкотреугольные, отогнутые	От 5 до 9	От 4 до 9	То же	2 (3)	Неправильная, со спинной стороны выпуклая, ребристая, с брюшной – плоская, бороздчатая	От 5 до 7	От 4 до 6
Королькова	Почти шаровидная, несколько приплюснутая с полюсов	Янтарно-оранжевый (коричневато-оранжевый)	Треугольно-ланцетные, отогнутые	От 10 до 11	От 7 до 9	Желтовато-янтарный	5	Трехгранная, на брюшной стороне килеватая, с выпуклой гладкой или слегка бороздчатой спинкой, с боков – неглубоко ямчатая	От 5 до 6	От 2 до 3
Желтый	Почти шаровидная или коротко-эллипсоидальная	Оранжевый (коричневато-оранжевый)	Продолговато-треугольные, цельные или с 1-2 зубцами с каждой стороны	От 7 до 10	От 7 до 9	Желтоватый	(2) 3-4 (5)	Неправильная треугольная, с боков ямчатая	От 5 до 6	От 3 до 4
Даурский	Коротко-эллипсоидальная или почти	Коричневато-красный или	Ланцетные, узкие	От 5 до 8	От 5 до 8	То же	3-4	Трехгранная, с боков сильно сжатая, с брюшной стороны	От 4 до 6	От 2 до 3

	шаровидная	оранжево-коричневый						выемчатая		
Однопестичный	Коротко-эллипсоидальная или округлая	Темно-красный (коричневато-красный)	Треугольные, отогнутые	От 5 до 6	От 4 до 6	То же	1	Округлая	От 3 до 5	От 3 до 4
Германский	Коротко-эллипсоидальная, к основанию слегка суженная	Темно-красный	Ланцето-треугольные, отогнутые	От 6 до 8	От 5 до 7	То же	1	Эллипсоидная, на спинке едва заметно ямчатая, с брюшной стороны почти плоская, с боковых сторон косточки с глубокими бороздками	От 6 до 7	От 4 до 5
Пятипестичный	Почти шаровидная или коротко-эллипсоидальная	Черный или пурпурно-черный с сизым налетом	Широкотреугольные с коротким остроконечием, прямостоящие	От 7 до 9	От 6 до 7	Красновато-коричневый	5 (3-4)	Трехгранная, со спинной стороны слегка бороздчатая, с боков гладкая, с брюшной стороны - килеватые	От 6 до 7	От 3 до 4
Восточно-балтийский	Коротко-эллипсоидальная, к основанию слегка суженная	Темно-красный	Ланцето-треугольные, отогнутые	От 7 до 9	От 5 до 7	Желтоватый	1	Эллипсоидная, на спинке едва заметно ямчатая, с брюшной стороны почти плоская, с боковых сторон косточки с глубокими бороздками	От 6 до 7	От 4 до 5
Отогнуточашелистиков	Продолговато-эллипсоидальная	Темно-красный,	Узкие продолговато-	От 9 до 13	От 6 до 10	Желтовато-	1	Эллипсоидная, с боков ямчатая, с	От 7 до 8	От 4 до 5

ый	ная или цилиндрическая	нередко с зелеными пятнышками	ланцетные, оттянутые в длинное остроконечие, отогнутые			оранжевый		каждой стороны с одной бороздкой		
Курземский	Эллипсоидальная или широкоэллипсоидальная	Темно-красный	Узкотреугольные, отогнутые	От 8 до 11	От 6 до 9	Желтоватый	1-2	У двухкосточковых плодов косточка эллипсоидальная, со спинки выпуклая неяснопродольно-бороздчатая на брюшной стороне плоская, ближе к краю с одной довольно глубокой бороздкой; у однокосточковых – косточка эллипсоидная, чуть приплюснутая с боков ближе к краю с каждой стороны с одной довольно глубокой бороздкой	От 5 до 9	От 4,5 до 6
Даугавский	Продолговато-эллипсоидальная, удлиненная или эллипсоидальная, в нижней части слегка суженная	Темно-красный	Ланцетные, заостренные, горизонтально простертые или приподнято-оттопыренные, иногда отогнутые	От 8 до 11	От 6 до 7	Желтоватый	1	Эллипсоидальная, на спинке неяснопродольно-бороздчатая, с боков слегка приплюснутая, с каждой стороны (ближе к основанию) с одной бороздкой, на	От 7 до 9	От 4 до 5

								брюшной стороне почти гладкая		

Порошок. При рассмотрении микропрепаратов должны быть видны фрагменты эпидермиса плода, состоящего из 4-6-угольных клеток с равномерно утолщенными стенками и желто-коричневым содержимым; фрагменты ткани с каменистыми клетками и одиночные каменистые клетки; фрагменты или целые волоски двух типов: одноклеточные, слегка извилистые, на концах заостренные, толстостенные и одноклеточные, со вздутиями, притупленные у верхушки и расширенные у основания, с тонкими стенками и коричневатым содержимым; фрагменты мякоти плода, состоящей из клеток, содержащих хромопласты оранжево-красного или коричневато-желтого цвета, мелкие друзы и призматические кристаллы оксалата кальция; должны быть видны одиночные друзы и призматические кристаллы оксалата кальция.

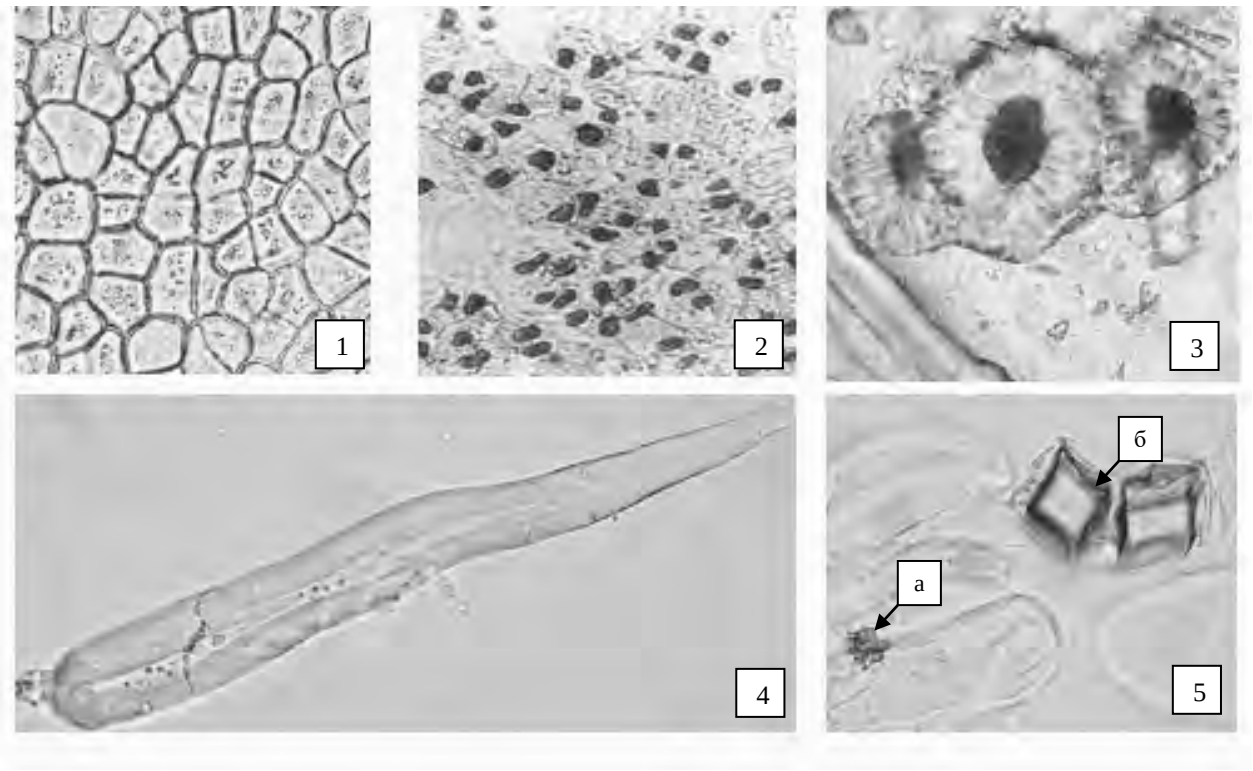


Рисунок – Боярышника плоды.
1 – клетки эпидермиса (200×), 2 – фрагмент мякоти с хромопластами (90×), 3 – группа каменистых клеток (200×), 4 - фрагмент волоска (200×), 5 – друза (а) и кристаллы (б) оксалата кальция (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор для детектирования 1. 1,0 г дифенилборилоксиэтиламина (дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира) растворяют в 100 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор для детектирования 2. 5 мл полиэтиленгликоля 400 смешивают со 100 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 6 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор стандартного образца (СО) гиперозида. Около 0,0025 г СО гиперозида растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около 1,0 г сырья, измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл спирта 96 %, нагревают с обратным холодильником на водяной бане при температуре 65 °С в течение 5 мин. После охлаждения до комнатной температуры полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля в виде полос длиной 10 мм, шириной не более 2 мм наносят 30 мкл испытуемого раствора и параллельно 2 мкл раствора СО гиперозида. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре в течение 15 мин, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 40 мин смесью растворителей этилацетат – ацетон – толуол – муравьиная кислота безвод-

ная – вода (20:10:10:5:5), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 - 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей. Хроматограмму обрабатывают раствором для детектирования 1, сушат, затем обрабатывают раствором для детектирования 2 и сразу выдерживают в

сушильном шкафу при 100-105 °С в течение 1-3 мин, просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО гиперозида должна обнаруживаться зона адсорбции желтого, зеленовато-желтого, желто-зеленого или желто-оранжевого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться следующие зоны адсорбции: зона желтого, зеленовато-желтого, желто-зеленого или желто-оранжевого цвета на уровне зоны СО гиперозида, зона светло-синего или синего цвета выше уровня зоны СО гиперозида, допускается обнаружение зоны розово-фиолетового, желтого, желто-зеленого или желто-оранжевого цвета и зоны светло-синего цвета ниже уровня зоны СО гиперозида; допускается обнаружение дополнительных зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, порошок* – не более 14 %.

Зола общая. *Цельное сырье, порошок* – не более 3 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, порошок* – не более 1 %.

Измельченность сырья. *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Подгоревшие плоды. *Цельное сырье* – не более 2 %.

Плоды недозрелые (коричневато-зеленые). *Цельное сырье* – не более 1 %.

Плоды, поврежденные вредителями, дробленые, отдельные косточки, веточки, плодоножки, в том числе отделенные при анализе. *Цельное сырье* – не более 5 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье* – не более 1 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье, порошок* – не более 0,5 %.

Примечание. Плодами, поврежденными вредителями, считаются те плоды, у которых имеются явные повреждения наружных покровов и мякоти плода вредителями, а именно борозды, ходы, изъеденные участки и т.д.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, порошок:* суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид – не менее 0,04 %.

Приготовление растворов.

Алюминия хлорида спиртовой раствор 2 %. 2 г алюминия хлорида растворяют в 50 мл спирта 70 % в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем раствора тем же растворителем до метки, перемешивают. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около 5,0 г (точная навеска) сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл спирта 96 %, присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на кипящей водяной бане в течение 60 мин, после охлаждения до комнатной температуры содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. В колбу со шротом прибавляют 30 мл спирта 96 %,

присоединяют к обратному холодильнику и нагревают в течение 60 мин. После охлаждения раствор фильтруют через тот же фильтр в ту же колбу. В колбу со шротом прибавляют 20 мл спирта 96 %, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают в течение 60 мин. После охлаждения раствор фильтруют через тот же фильтр в ту же колбу. Объем раствора в колбе доводят спиртом 96 % до метки (раствор А испытуемого раствора).

10 мл раствора А испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 6 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 %, доводят спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора). Оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора измеряют на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 10 мл раствора А испытуемого раствора, 0,1 мл уксусной кислоты концентрированной, помещенный в мерную колбу вместимостью 25 мл и доведенный спиртом 96 % до метки.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 10 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 25000}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)};$$

где:

A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса гиперозида с алюминия хлоридом при длине волны 410 нм, равный 380;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Боярышника цветки	**ФС.2.5.0062.18**
Crataegi flores	**Взамен ГФ XI ст. 8**

Собранные в начале цветения и высушенные соцветия дикорастущих и культивируемых кустарников или небольших деревьев: боярышника кровяно-красного – *Crataegus sanguinea* Pall.; боярышника сглаженного – *C. laevigata* (Poir.) DC. (боярышника колючего – *C. oxyacantha sensu* Pojark.); боярышника Королькова – *C. korolkowii* L. Henry; боярышника [алтайского – *C. altaica* (Loud.) Lange]; боярышника желтого – *C. chlorocarpa* Lenne et C. Koch; боярышника даурского – *C. dahurica* Koehne ex Schneid.; боярышника однопестичного – *C. monogyna* Jacq.; боярышника германского – *C. alemanniensis* Cin.; боярышника восточно-балтийского – *C. orientobaltica* Cin.; боярышника отогнуточашелистикового – *C. curvisepala* Lindm.; боярышника курземского – *C. X curonica* Cin.; боярышника даугавского – *C. X dunensis* Cin.; боярышника пятипестичного – *C. pentagyna* Waldst. et Kit., сем. розоцветных – *Rosaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Смесь цельных щитковидных, реже зонтиковидных соцветий и их частей – отдельных цветков, бутонов, цветоножек, лепестков, тычинок и пыльников. Цветки правильные, с двойным околоцветником, состоящим из 5 продолговато-треугольных, треугольных или узких ланцетных зеленоватых чашелистиков и 5 овальных коричневато- или желтовато-белых лепестков; тычинок до 20, с красными пыльниками, столбиков 1-5; цветоножки обычно голые или слабо опушенные, длиной до

35 мм. Диаметр распустившихся цветков 10-15 мм, бутонов – 3-4 мм. Запах слабый, своеобразный. Вкус водного извлечения слабо-горький.

Порошок. При рассмотрении порошка сырья под лупой (10 ×) или стереомикроскопом (16 ×) видна смесь частей цветоносов соцветий, бутонов, цветков, лепестков, чашелистиков, тычинок, пыльников и пыльцы, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Цвет зеленый, беловато-жёлтый. Запах слабый, своеобразный. Вкус водного извлечения слабогорький.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении препаратов чашелистиков и лепестков с поверхности должны быть видны клетки эпидермиса, имеющие с наружной стороны прямые или слабо извилистые стенки и складчатую кутикулу. Устьица крупные, редкие, аномоцитного типа, расположенные на чашелистиках с наружной стороны. Клетки внутреннего эпидермиса лепестков имеют сосочковидные выросты. По краю чашелистиков расположены многоклеточные шаровидные железки (сидячие и на многоклеточных «ножках») с желтовато-коричневым содержимым; на поверхности – многочисленные простые, одноклеточные волоски с толстыми стенками, гладкие, на верхушке заостренные, прямые или слегка изогнутые, у основания слегка расширенные и окруженные розеткой из 5 эпидермальных клеток. В мезофилле чашелистиков и завязи имеются друзы, изредка встречаются призматические кристаллы оксалата кальция.

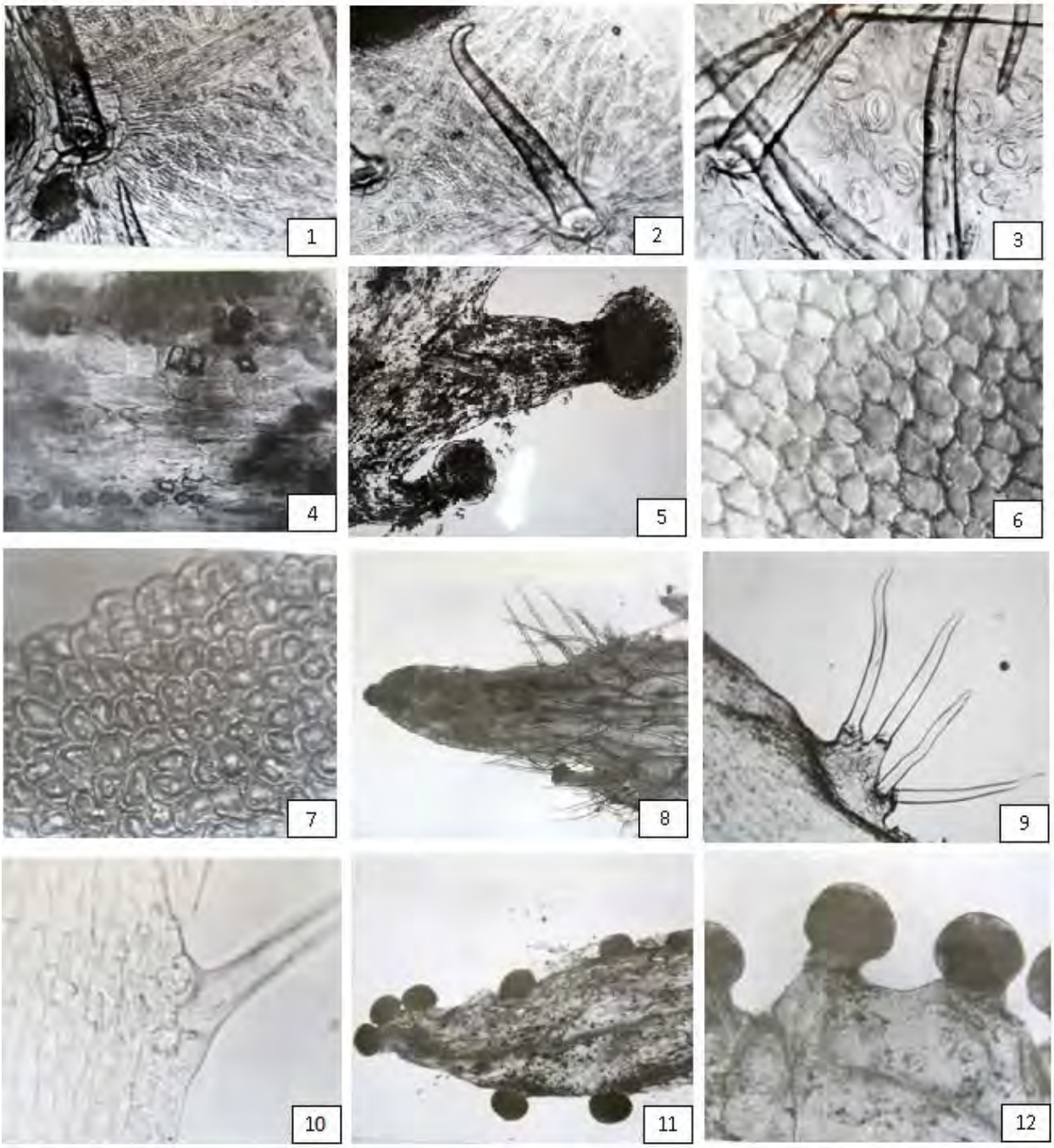


Рисунок – Боярышника цветки.

1 – эпидермис верхней стороны прицветника: складчатость кутикулы (200 ×); 2 – эпидермис верхней стороны прицветника: простой, слегка изогнутый волосок, место прикрепления волоска (200 ×); 3 – эпидермис нижней стороны прицветника: простые волоски, складчатость кутикулы, устьица (200 ×); 4 – фрагмент жилки, друзы и одиночные кристаллы (200 ×); 5 – желёзки на многоклеточных ножках по краю прилистника (80 ×); 6 – эпидермис лепестка с наружной стороны: складчатость кутикулы, сосочковидные выросты (400 ×); 7 – эпидермис лепестка внутренней стороны: складчатость кутикулы, сосочковидные выросты (400 ×); 8 – чашелистик: желёзки и простые волоски (35 ×); 9

– эпидермис по краю чашелистика (35 ×); 10 – место прикрепления волоска; 11 – шаровидные желёзки на верхушке прицветника (35 ×); 12 – шаровидные желёзки по краю прицветника (90 ×).

Порошок. При рассмотрении микропрепаратов порошка с поверхности должны быть видны фрагменты цветков, чашелистиков и лепестков с клетками эпидермиса, имеющими с наружной стороны прямые или слабо извилистые стенки и складчатую кутикулу; крупные редкие устьица, аномоцитного типа. Также встречаются фрагменты лепестков, имеющие эпидермис с сосочковидными выростами. Встречаются фрагменты края чашелистиков с многоклеточными шаровидными железками (сидячие и на многоклеточных «ножках») с желтовато-коричневым содержимым. На поверхности фрагментов чашелистиков видны многочисленные простые, одноклеточные волоски с толстыми стенками, гладкие, на верхушке заостренные, прямые или слабоизогнутые, у основания слегка расширенные и окруженные розеткой из 5 эпидермальных клеток. В мезофилле чашелистиков, лепестков и завязи имеются друзы, реже призматические кристаллы оксалата кальция.

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) гиперозида. Около 0,005 г СО гиперозида растворяют при нагревании в 10 мл спирта 96 % при нагревании на водяной бане.

Раствор стандартного образца (СО) кверцетина. Около 0,005 г СО кверцетина растворяют при нагревании в 10 мл спирта 96 % при нагревании на водяной бане.

Раствор стандартного образца (СО) рутина. Около 0,005 г СО рутина растворяют при нагревании в 10 мл спирта 96 % при нагревании на водяной бане.

Около 0,5 г измельченного сырья (см. раздел «Количественное определение») помещают в круглодонную колбу и нагревают с 5 мл спирта 96 % на

кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 15 мин. После охлаждения извлечение декантируют (испытуемый раствор).

На линию старта высокоэффективной хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 10 мкл (0,01 мл) испытуемого раствора, рядом наносят 10 мкл (0,01 мл) раствора СО гиперозида, 10 мкл (0,01 мл) раствора СО кверцетина, 10 мкл (0,01 мл) раствора СО рутина. Пластинку с нанесенными пробами высушивают на воздухе в течение 5 мин, помещают в камеру со смесью растворителей этилацетат-бутанон-2-муравьиная кислота-вода (30:10:5:5) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет 80 - 90 % от линии старта пластинки, ее вынимают из камеры, высушивают в вытяжном шкафу до удаления следов растворителей. Пластинку опрыскивают последовательно дифенилборилоксиэтиламина раствором 1 % в спирте 96 % и полиэтиленгликоля раствором 5 % в спирте 96 %, выдерживают при температуре 100 - 105 °С в течение 2-5 мин и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией желтого, оранжевого или оранжево-зеленого цвета на уровне зоны адсорбции СО кверцетина; две зоны адсорбции с флуоресценцией желтого цвета, одна из которых - на уровне зоны адсорбции СО гиперозида, другая - чуть выше; зона адсорбции с флуоресценцией желтого цвета на уровне зоны адсорбции СО рутина; зона адсорбции с флуоресценцией от голубого до синего цвета ниже зоны адсорбции СО гиперозида; зона адсорбции с флуоресценцией от голубого до синего цвета ниже зоны адсорбции СО кверцетина; допускается обнаружение других зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, порошок* – не более 14 %.

Зола общая. *Цельное сырье, порошок* – не более 12 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, порошок* – не более 3,5 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* измельченных частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, – не более 5 %. *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %; измельченных частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Веточки, листья. *Цельное сырье* – не более 6 %.

Цветков, утративших естественную окраску. *Цельное сырье* – не более 3 %.

Органической примеси. *Цельное сырье* – не более 0,5 %.

Минеральной примеси. *Цельное сырье* – не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, порошок:* гиперозида не менее 0,5 %.

Гиперозид

Приготовление растворов

Раствор стандартного образца (СО) гиперозида. Около 0,05 г (точная навеска) СО гиперозида, высушенного при температуре 100 - 105 °С до по-

стоянной массы, помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 40,0 мл спирта 96 % и нагревают на водяной бане в колбе с обратным холодильником до полного растворения кристаллов. После охлаждения раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают. Срок годности 30 сут.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Около 2,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, приливают 100,0 мл спирта 96 %, взвешивают с погрешностью ± 0,01 г, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 1 ч. После охлаждения до комнатной температуры колбу вновь взвешивают и доводят до первоначальной массы спиртом 96 %. Содержание колбы фильтруют через воронку диаметром 7 см с вложенным ватным тампоном толщиной не более 0,5 см, отбрасывая первые 30,0 мл фильтрата.

50,0 мл фильтрата переносят в круглодонную колбу со шлифом вместимостью 100 мл и упаривают на ротационном испарителе под вакуумом до объема 2-3 мл. Упаренное извлечение количественно переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки, перемешивают и дают осесть образовавшемуся аморфному осадку (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки размером 15 × 15 см наносят 80,0 мкл (0,08 мл) испытуемого раствора полосой длиной 5 см на расстоянии 1,5 см от края, рядом наносят 80,0 мкл (0,08 мл) 0,1 % раствора СО гиперозида. Пластинку с нанесенными пробами высушивают на воздухе в течение 5 мин и хроматографируют в системе хлороформ-метанол (8:2) без предварительного насыщения. Когда фронт растворителей дойдет до конца пластинки, ее вынимают из камеры, высушивают в вытяжном шкафу в течение 2 мин и повторно хроматографируют в той же системе, сушат до удаления следов растворителей и просматривают в УФ-свете при

длине волны 365 нм. Отмечают зоны адсорбции гиперозида на хроматограммах испытуемого раствора и раствора СО гиперозида. Вырезают участки пластинки с зонами адсорбции, а также чистый участок равной площади этой же пластинки для контрольного опыта, разрезают каждый на кусочки размером 0,3 - 0,5 см, помещают в колбы со шлифами вместимостью 50 мл, прибавляют по 10,0 мл смеси диоксан - вода (1:1), закрывают пробками и встряхивают в течение 1 ч. Содержимое колб переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют со скоростью 1000 об/мин в течение 5 мин. Оптическую плотность элюатов измеряют на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 365 нм. В качестве раствора сравнения используют элюат контрольного опыта.

Содержание гиперозида в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$(\mathrm{X}) = \frac{A \cdot a_0 \cdot 10 \cdot 100 \cdot \mathrm{P} \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 50 \cdot 50 \cdot (100-W)} =$$

$$= \frac{A \cdot a_0 \cdot \mathrm{P} \cdot 4000}{A_0 \cdot a \cdot (100-W)},$$

где A – оптическая плотность испытуемого элюата;
A_o – оптическая плотность элюата СО гиперозида;
a_o – навеска СО гиперозида, г;
P – содержание основного вещества в СО гиперозида, %;
a – навеска сырья, г;
W – влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Брусники обыкновенной листья **ФС.2.5.0063.18**

Vaccinii vitis-idaeae folia **Взамен ГФ XIст.27**

Собранные до начала цветения или после созревания плодов и высушенные листья многолетнего вечнозеленого дикорастущего кустарничка брусники обыкновенной– *Vaccinium vitis-idaea* L.*,* семейства вересковых – *Ericaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.*Смесь цельных или частично измельченных листьев. Листья короткочерешковые, кожистые, эллиптические или обратнояйцевидные, на верхушке притупленные или слабовыемчатые с цельными или слегка зазубренными, завернутыми вниз краями, длиной
7 – 30 мм, шириной 5 – 15 мм. При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) на нижней поверхности листа видны многочисленные темно-коричневые точки (железки).Черешки листьев в поперечном сечении округло-треугольной формы, покрытые волосками.

Цвет листьев сверху зеленый или темно-зеленый, снизуотсветло-зеленого до серовато-зеленого с ясно заметными темно-коричневыми точками (железки)изредка с коричневыми, фиолетово-коричневыми или розовато-фиолетовыми пятнами.Запах отсутствует, вкус водного извлечения горький, вяжущий.

Измельченное сырье. Кусочки листьев различной формыи черешков, проходящих сквозь сито 3 мм. При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки листьев различной формы, на нижней поверхности листьев многочисленные темно-коричневые точки (железки).

Цвет от серовато-зеленого или светло-зеленого до темно-зеленогос ясно заметными темно-коричневыми точками (железки) с редкими коричневыми, фиолетово-коричневыми или розовато-фиолетовыми вкраплениями. Запах отсутствует, вкус водного извлечения горький, вяжущий.

Порошок. Кусочки листьеви черешков, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки листьев от серовато-зеленого,светло-зеленого до темно-зеленого с темными точками (железки)с коричневато-зелеными, светло-коричневыми, фиолетово-коричневыми или розовато-коричневыми и коричневыми вкраплениями.

Запах отсутствует, вкус водного извлечения горький, вяжущий.

Микроскопические признаки. *Цельное, измельченное сырье.* При рассмотрении листа с поверхности должны быть видны клетки верхнего и нижнего эпидермиса со слегка извилистыми боковыми стенками и четковидным утолщением клеточных стенок, на нижнем эпидермисе вокруг железок клетки с почти прямыми стенками; устьицарасполагаются на нижнем эпидермисе; устьица мелкие, окруженные двумя околоустьичными клетками, смежные клетки которых расположены параллельно устьичной щели (парацитный тип).На нижней стороне листа должны быть железки, состоящие из многоклеточной ножки, постепенно переходящей в овальную многоклеточную головку с коричневым содержимым; простыеволоски редкие одноклеточные толстостенные прямые или изогнутые с гладкой или со слабобородавчатой поверхностью; встречаются по жилкам и на черешке; в мезофиле содержатся редкие одиночные призматические кристаллы и друзы оксалата кальция.

Клетки эпидермиса черешка прозенхимной формы. Эпидермис опущен многочисленными одноклеточными прямыми или изогнутыми волосками с толстыми стенками и гладкой или слабобородавчатой поверхностью. Под эпидермисом в три-четыре слоя залегает колленхима.

Проводящая система черешка представлена одним крупным коллатеральным пучком, расположенным в центре. Над флоэмой проводящего пучка залегает группа лубяных волокон.

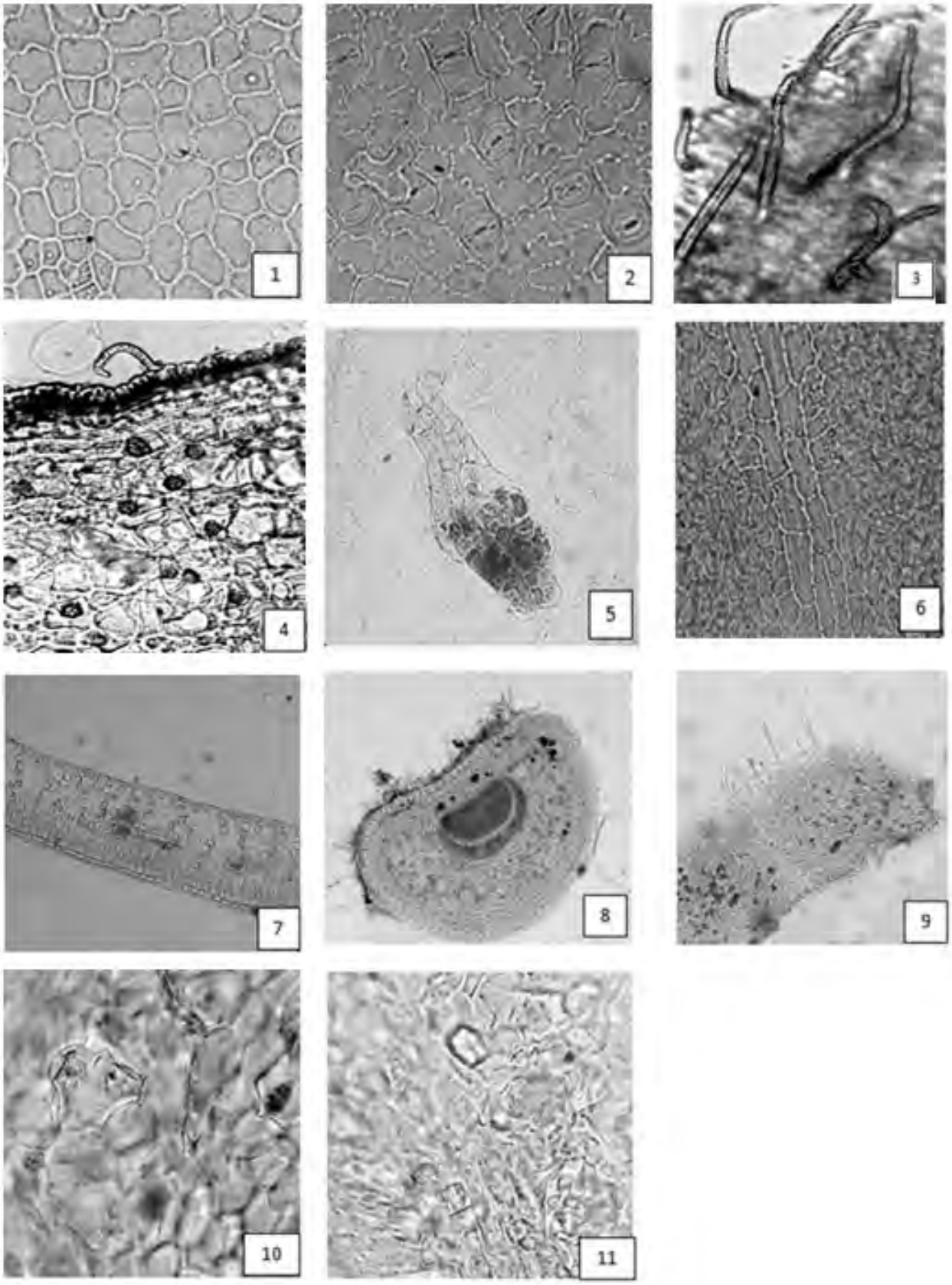


Рисунок – Брусники обыкновенной листья

1 – фрагмент верхнего эпидермиса листа (400×); 2 – фрагмент нижнего эпидермиса листа с устьицами (парацитный тип) (400×); 3 – фрагмент эпидермиса листа вдоль жилки с одноклеточными изогнутыми волосками с толстыми стенка-

ми и гладкой или слабобородавчатой поверхностью (200×); 4 – фрагмент эпидермиса листа вдоль жилки с одноклеточными прямыми волосками с толстыми стенками и гладкой или слабобородавчатой поверхностью (100×);5 – фрагмент нижнего эпидермиса листа с железкой (400×); 6 – фрагмент эпидермиса листа вдоль жилки (400×); 7 – поперечный срез листа (100×); 8 – поперечный срез черешка (40×); 9 – фрагмент эпидермиса черешка с одноклеточными прямыми или изогнутыми волосками с толстыми стенками и гладкой или слабобородавчатой поверхностью (100×); 10 – фрагмент мезофилла черешка с друзами оксалата кальция (400×); 11 – фрагмент мезофилла черешка с одиночными призматическими кристаллами оксалата кальция (400×).

Порошок. При рассмотрении микропрепарата порошка должны быть видны фрагментыклеток эпидермиса со слегка извилистыми утолщенными боковыми стенками, фрагментыустьиц с 2 околоустьичными клетками, смежные стенки которых расположены параллельно устьичной щели (парацитный тип); фрагментыклеток эпидермиса с железками, состоящими из многоклеточной ножки, постепенно переходящей в овальную многоклеточную головку с коричневым содержимым; волоски простые, толстостенные, прямые или изогнутые с гладкой или слабобородавчатой поверхностью или их фрагменты; фрагменты мезофилла с друзами и одиночными призматическими кристаллами оксалата кальция.В микропрепарате также обнаруживаются фрагменты черешка листа.

Определение основных групп биологически активных веществ

1. Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) арбутина. Около 0,01 г СО арбутина помещают в колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 8,0 мл спирта 70 % и нагревают на водяной бане до полного растворения. Затем раствор охлаждают, доводят объем раствора тем же спиртом до 10 мл и перемешивают.
Срок годности раствора 3 мес.

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля на алюминиевой подложке, размером 10×15 см наносят 60 мкл (0,06 мл) испытуемого раствора(см. раздел «Количественное определение арбутина», раствор А; 10 мл раствора А пропускают через колонку с алюминия оксидомнейтральным для хроматографии и используют для хроматографирования), рядом наносят 10 мкл (0,01 мл) раствора СОарбутина. Пластинку с нане-

сенными пробами сушат на воздухе в течение 5 мин, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 30 мин смесью растворителей:этилацетат–кислота муравьиная– вода (88:6:6) и хроматографируют восходящим способом.

Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90% длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, обрабатывают натрия фосфорномолибдата раствором 10 %, выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100 - 105 °С в течение 10 мини просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СОарбутина должна обнаруживатьсязона адсорбциисинего цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбциисинего цвета на уровне зоны арбутина и 2 зоны адсорбции синего цвета ниже и выше арбутина;допускается обнаружение дополнительных зон адсорбции.

Качественные реакции

Около 0,5 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм,помещают в колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 10,0 мл воды и кипятят в течение 2 – 3 мин, затем фильтруют через бумажный фильтр.

К 1 мл фильтрата (в фарфоровой чашке) прибавляют 4,0 мл раствора аммиака и по каплям 1,0 мл натрия фосфорномолибдата раствор 10 %; должно наблюдаться синее окрашивание (арбутин).

К 2 мл фильтрата (в фарфоровой чашке) прибавляют 0,1 мл железа(III) аммония сульфата раствора 1 %; должно наблюдаться зеленовато-черное окрашивание (дубильные вещества).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность.*Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 13 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 7 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 0,5 %.

Измельченность сырья.*Цельное сырье*: частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, – не более 2 %. *Измельченное сырье*: частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, – не более 5 %. Частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм,– не более 5 %. *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Листьев почерневших и потемневших с обеих сторон.*Цельное сырье*– не более 7 %.

Кусочков почерневших и потемневших листьев. *Измельченное сырье, порошок* – не более 7 %.

Других частей растения. *Цельное сырье*– не более 1 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье*– не более 1 %.

Минеральная примесь.*Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение.*Цельное сырье, измельченное сырье, порошок:* содержание арбутина – не менее 4,5 %, экстрактивных веществ, извлекаемых водой – не менее 18 %.

Арбутин

Приготовления раствора СО арбутина. Около 0,1 г (точная навеска) СО арбутина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 80 мл спирта 70 % и нагревают на водяной бане до полного растворения. Затем раствор охлаждают, доводят объем тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор А СО арбутина). Срок годности раствора 3 мес.

7,0 мл раствора А СО арбутина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят спирта 70 % до метки и перемешивают (раствор Б СО арбутина).

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

Около 0,5 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100,0 мл спирта 70 % и взвешивают с погрешностью ±0,01 г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на кипящей водяной бане в течение 45 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Затем колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и при необходимости доводят до первоначальной массы спиртом 70%. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр, смоченный тем же спиртом, отбрасывая первые 10,0 мл фильтрата (раствор А испытуемого раствора).

Для очистки полученного извлечения от сопутствующих веществ, 3 мл раствора Аиспытуемого раствора пропускают через стеклянную хроматографическую колонкудиаметром 1,5 см и высотой 25 см, заполненную 3,0 г алюминия оксида нейтрального для хроматографии (L 40/250 мкм), предварительно промытую 5 мл спирта70 %. Колонку элюируют 15,0 мл спирта 70 %. Элюат собирают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора).

Оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора измеряют на спектрофотометрепри длине волны 285 нм в кювете с толщиной рабочего слоя

10 мм. В качестве раствора сравнения используют спирт 70 %, который предварительно пропускают через колонку с алюминия оксидом.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО арбутина. В качестве раствора сравнения используют спирт 70 %.

Содержание арбутинав абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по следующей формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 7 \cdot 100 \cdot 100 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot 3 \cdot (100 - W) \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100} = \frac{A \cdot a_0 \cdot 175 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot 3 \cdot (100 - W)};$$

где: A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;

A_0 –оптическая плотность раствораБСО арбутина;

a– навеска сырья, г;

a_0– навеска СО арбутина, г;

W – влажность сырья, %;

P – содержание основного вещества в СО арбутина, %.

Допускается содержание арбутина в сырье вычислять с использованием удельного показателя поглощения по следующей формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 3 \cdot (100 - W)};$$

где A– оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения арбутина, равный 72,23;

a– навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Определение экстрактивных веществ, извлекаемых водой, проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (навеска сырья – 1,0 г, экстрагент – вода очищенная).

Примечание. Определение арбутина проводят в сырье, предназначенном для производства лекарственных растительных препаратов (пачка, фильтр-пакеты), экстрактивных веществ, извлекаемых водой в сырье, предназначенном для производства экстрактов.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Бузины черной цветки **ФС.2.5.0008.15**

Sambuci nigrae flores

Собранные в период цветения, высушенные и обмолоченные цветки и бутоны дикорастущего и культивируемого кустарника бузины черной – *Sambucus nigra* L., сем.бузиновых – *Sambucaceae* (жимолостных – *Caprifoliaceae*).

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Смесь отдельных цветков, бутонов на коротких голых цветоножках длиной до 2–3 мм и без них, частей соцветий. Цветки с пятизубчатой спайнолепестной чашечкой и венчиком из 4–5 лепестков, сросшихся у основания, диаметром до 8 мм. Диаметр бутонов – до 3 мм. Лепестки венчика широко-яйцевидные, почти округлые. Чашелистики треугольные, эллиптические или яйцевидные желтовато-зеленого цвета. Тычинок 5, приросших к трубке венчика, завязь почти шаровидная короткая полунижняя, трехгнездная. Цвет желтоватый или желтый. Запах характерный. Вкус водного извлечения пряный.

Измельченное сырье. При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны отдельные цельные цветки, бутоны на коротких голых цветоножках и без них, части цветков, бутонов и цветоножек, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.

Цвет желтоватый или желтый с беловато- или зеленовато-серыми вкраплениями. Запах характерный. Вкус водного извлечения пряный.

Порошок. При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видна смесь частиц цветков, бутонов и

цветоножек, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

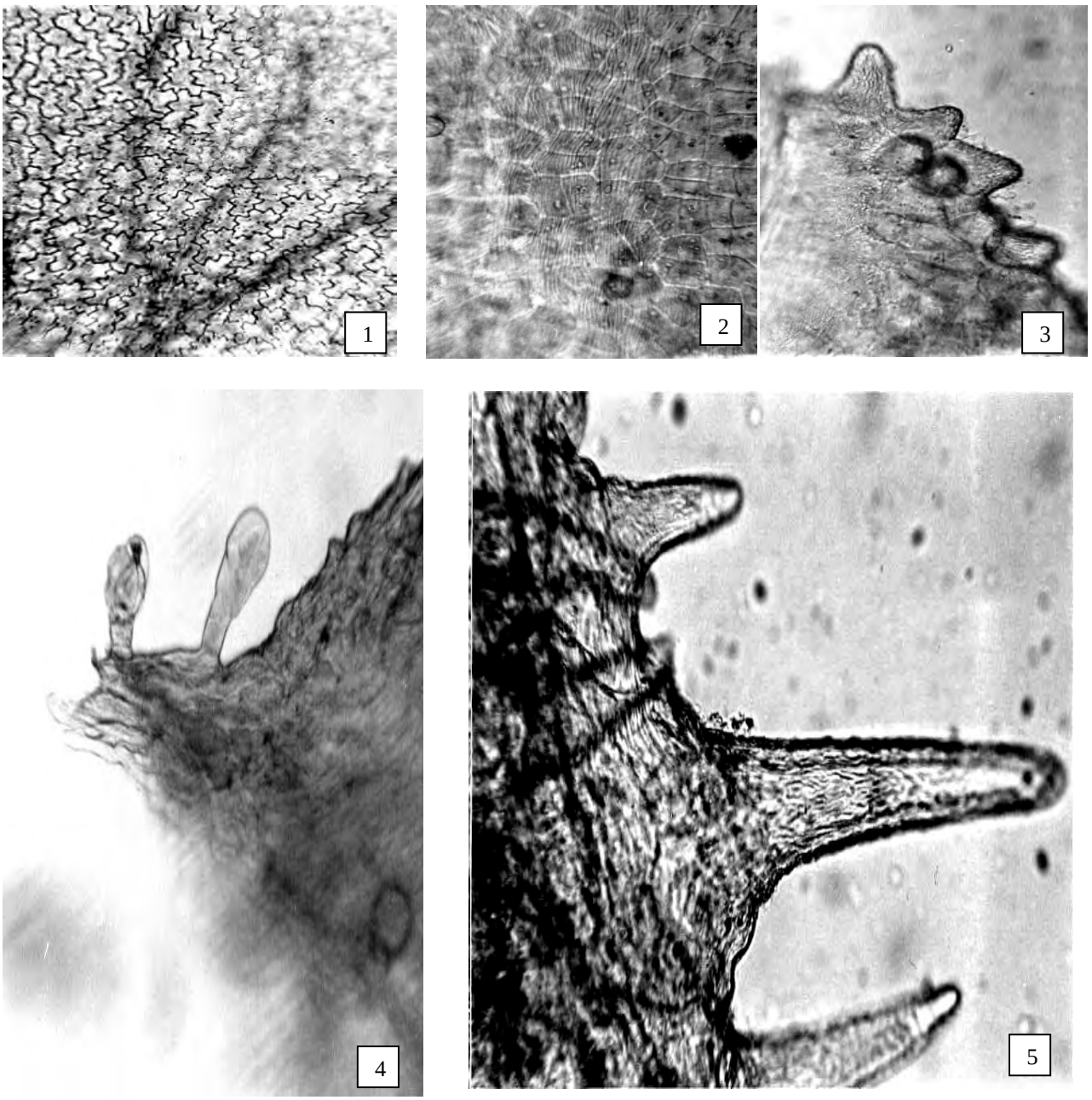
Цвет желтоватый или желтый. Запах характерный. Вкус водного извлечения пряный.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье, измельченное сырье*. При рассмотрении лепестка с поверхности должны быть видны многоугольные со слабоизвилистыми тонкими стенками клетки верхнего эпидермиса по краю с сосочковидными выростами; эпидермис нижней стороны лепестка характеризуется более крупными клетками с сильноизвилистыми стенками. Клетки эпидермиса по краю с сосочковидными выростами. Устьица только на нижней стороне лепестка, округлые, аномоцитного типа. Кутикула с обеих сторон лепестка морщинистая. Редко с нижней стороны лепестка (у его основания) могут встречаться простые и железистые волоски. Простые волоски одноклеточные, тонкостенные, со штриховатой кутикулой. Железистые волоски крупные с одно- и многоклеточной округлой или овальной головкой, различной формы на одно- и многоклеточной ножке.

Клетки верхнего эпидермиса чашелистика слегка вытянуты, с тонкими слабоизвилистыми стенками. Клетки эпидермиса с нижней стороны чашелистика более крупные, слегка вытянуты, с извилистыми тонкими стенками. Кутикула с обеих сторон морщинистая. Устьица расположены в основном с нижней стороны, округлые, аномоцитного типа. С верхней и нижней стороны чашелистика имеются сосочковидные выросты, особенно много их по краю. С нижней стороны чашелистика встречаются простые и железистые волоски. Простые волоски одноклеточные, тонкостенные, со штриховатой кутикулой. Железистые волоски крупные с одно- и многоклеточной головкой, различной формы на одно- и многоклеточной ножке. Пыльца трехбороздная, эллипсоидальная, гладкая.

Эпидермис цветоножки представлен вытянутыми прямоугольными клетками с ровными стенками, с овальными устьицами и нередко с сосочковидными выростами. Эпидермис цветоножки у основания цветка обильно покрыт головчатыми и простыми волосками.

Порошок. При рассмотрении микропрепаратов должны быть видны: фрагменты эпидермиса лепестка с многоугольными слабоизвилистыми стеками клеток и сосочковидными выростами; фрагменты эпидермиса лепестка с сильноизвилистыми стенками клеток и округлыми устьицами, фрагменты эпидермиса чашелистика со слабоизвилистыми стенками клеток и округлыми устьицами; на эпидермисе лепестка и чашелистика видна складчатость кутикулы; отдельные простые и одноклеточные волоски с тонкими стенками и штриховатой кутикулой и головчатые волоски – крупные, с округлой или овальной одно- и многоклеточной головкой на одно- и многоклеточной ножке или фрагменты волосков; фрагменты эпидермиса цветоножки с прямоугольными клетками с ровными стенками, с овальными устьицами, сосочковидными выростами, могут быть с простыми и головчатыми волосками; трехбороздная эллипсоидальная гладкая пыльца.



Рисунок– Бузины черной цветки.
1 – фрагмент нижнего эпидермиса лепестка со складчатой кутикулой (125×);
2 – фрагмент верхнего эпидермиса лепестка со складчатой кутикулой (250×);
3 – фрагмент чашелистика с сосочковидными выростами (250×);
4 – фрагмент чашелистика с головчатыми волосками (125×);5 – фрагмент эпидермиса цветоножки с простыми волосками (250×).

Определение основных групп биологически активных веществ

1. ***Тонкослойная хроматография***

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 50 мкл испытуемого раствора (см. раздел «Количественное определение»приготовление раствора А испытуемого

раствора) и 50 мкл раствора стандартного образца (СО) рутина (см. раздел «Количественное определение» приготовление раствора А СО рутина). Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную смесью растворителей этилацетат – метанол– вода (77:12:11), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80–90% длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей. Затем пластинку обрабатывают алюминия хлорида спиртовым раствором 2 %, выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100 - 105 °С в течение 2 – 3 мини просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме СО рутина должна обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией ярко-желтого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться 2 зоны адсорбции с флуоресценцией ярко-желтого цвета: зона адсорбции на уровне зоны адсорбции СО рутина и еще одна зона адсорбции над ней; допускается обнаружение других зон адсорбции(флавоноиды).

2. ***Качественные реакции***

Аналитическую пробу сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. 1,0 г измельченного сырья помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 20 мл спирта 50 % и нагревают на водяной бане при температуре 60 °С в течение 15 мин. Затем извлечение охлаждают до комнатной температуры, фильтруют через бумажный фильтр и упаривают до 1 мл. К полученному извлечению прибавляют 1 мл спирта 96 %, 0,1 г порошка магния и 1 мл хлористоводородной кислоты концентрированной; постепенно появляется розово-красное окрашивание (флавоноиды).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* –не более 14 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 10 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* –не более 2 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* измельченных частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, –не более 5 %.*Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, –не более 5 %; измельченных частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, –не более 5 %. *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, –не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, –не более 5 %.

Посторонние примеси

Цветки, изменившие окраску. *Цельное сырье, измельченное сырье*–не более 8 %.

Другие части растения (цветоносы, веточки, листья). *Цельное сырье, измельченное сырье*–не более 10 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* –не более 1 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 1 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок:* сумма флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 2 %; экстрактивных веществ, извлекаемых водой, –не менее 30 %.

Сумма флавоноидов

Приготовление растворов.

Раствор СО рутина. Около 0,05 г (точная навеска) СО рутина, высушенного в течение 3 ч при температуре 130–135 °С, растворяют при нагревании в спирте 70 % в мерной колбе вместимостью 50 мл. После охлаждения до комнатной температуры доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивают (раствор АСО рутина). Срок годности раствора 1 мес при хранении в прохладном защищенном от света месте.

1,0 мл раствора А СО рутина, 10 мл спирта 96 %, 0,5 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, 1,5 мл алюминия хлорида раствора 10 %, помещенных в мерную колбу вместимостью 25 мл и доведенных спиртом 70 %до метки (раствор Б СО рутина).Срок годности раствора 1 мес при хранении в прохладном защищенном от света месте.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г(точная навеска)измельченного сырья помещают в круглодонную колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 60 мл спирта 70 %, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане в течение 45 мин. После охлаждения до комнатной температуры содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл, чтобы частицы сырья не попали на фильтр. В круглодонную колбу со шлифом прибавляют 45 мл спирта 70 %, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане в течение 15 мин. После охлаждения до комнатной температуры извлечение фильтруют через тот же фильтр в ту же мерную колбу, доводят объем раствора в колбе спиртом 70 % до метки и тщательно перемешивают (раствор А испытуемого раствора).

5,0 мл раствора А испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и

перемешивают (раствор Б испытуемого раствора).

5,0 мл раствора Б испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 10 мл спирта 96 %, 0,5 мл уксусной кислотыразведенной30 %, 1,5 мл алюминия хлоридараствора10 %, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и тщательно перемешивают (раствор В испытуемого раствора).

Оптическую плотность раствора В испытуемого раствора измеряют через 30 мин на спектрофотометре при длине волны 408 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 5,0 мл раствора Б испытуемого раствора, 10 мл спирта 96 %, 0,5 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, доведенный спиртом 70 %до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО рутина. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из1,0 мл раствора А СО рутина, 10 мл спирта 96 %, 0,5 мл уксусной кислотыразведенной30 %, доведенный спиртом 70 %до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье в процентах в (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 25 \cdot 1 \cdot P \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 5 \cdot 5 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot a_0 \cdot P \cdot 200}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где: *A*–оптическая плотность раствора В испытуемого раствора;
A_o–оптическая плотность раствора Б СО рутина;
A–навеска сырья, г;
a_o– навеска СО рутина, г;
P–содержание основного вещества в СО рутина, %;
W– влажность сырья, %.

Допускается содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин вычислять с использованием удельного показателя поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 5 \cdot 5 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 250000}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где: *A*–оптическая плотность раствор В испытуемого раствора;

$A_{1см}^{1\%}$ –удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при длине волны 408нм, равный 248;

A–навеска сырья, г;

W– влажность сырья, %.

Экстрактивные вещества. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1, из навески 1,0 г сырья, экстрагент - вода).

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Валерианы лекарственной **ФС.2.5.0009.15**

корневища с корнями

Valerianae officinalis rhizomata cum radicibus

Собранные осенью или ранней весной, освобожденные от остатков листьев и стеблей, отмытые от земли и высушенные корневища с корнями многолетнего дикорастущего и культивируемого травянистого растения валерианы лекарственной –*Valeriana officinalis* L. s. l., сем. валериановых– *Valerianaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье*. Корневища цельные или разрезанные, длиной до 4 см, толщиной до 3 см, часто с рыхлой или полой с поперечными перегородками сердцевиной. От корневища отходят многочисленные придаточные корни, редко подземные побеги – столоны. Корни гладкие или слегка продольно-морщинистые, ломкие, различной длины, часто отделены от корневища.

Цвет корневищ и корней снаружи желтовато-коричневый, беловато-коричневый, коричневый, темно-коричневый, на изломе желтоватый, желтовато-белый, светло-коричневый, коричневый.Запах сильный, характерный. Вкус водного извлечения пряный, сладковато-горький.

Измельченное сырье. При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки корневищ различной формы и цилиндрические кусочки корней с гладкой или слегка продольно-морщинистой поверхностью, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.

Цвет кусочков желтовато-, серовато-, беловато-коричневый, коричневый или темно-коричневый.Запах сильный, характерный. Вкус водного извлечения пряный, сладковато-горький.

Порошок. При рассмотрении порошка под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×)видны кусочки корней и корневищ различной формы с гладкой или слегка продольно-морщинистой поверхностью, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

Цвет желтовато-коричневый с беловато-коричневыми, желтовато-белыми, светло-коричневыми, коричневыми и темно-коричневыми вкраплениями.Запах сильный, характерный. Вкус водного извлечения пряный, сладковато-горький.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении микропрепаратов поперечного среза корня должен быть виден эпидермис (ризодерма), клетки которого образуют корневые волоски в виде коротких или удлиненных сосочков. Клетки прилегающей гиподермы крупные, часто с каплями эфирного масла. Кора широкая, состоит из однородных округлых паренхимных клеток, заполненных крахмальными зернами. Молодые корни имеют первичное строение: в центральном осевом цилиндре видно кольцо эндодермы, состоящей из клеток с утолщенными радиальными стенками, и группы сосудов. Редко встречаются старые корни с лучистой древесиной (вторичное строение).

На поперечном срезе корневища видна покровная ткань, представленная пробкой. Клетки паренхимы округлые, заполнены крахмальными зернами. По периметру нередко видны конусовидные зачатки корней. Открытые коллатеральные сосудисто-волокнистые пучки, часто искривленные, окружают одним, реже двумя кольцами сердцевину.

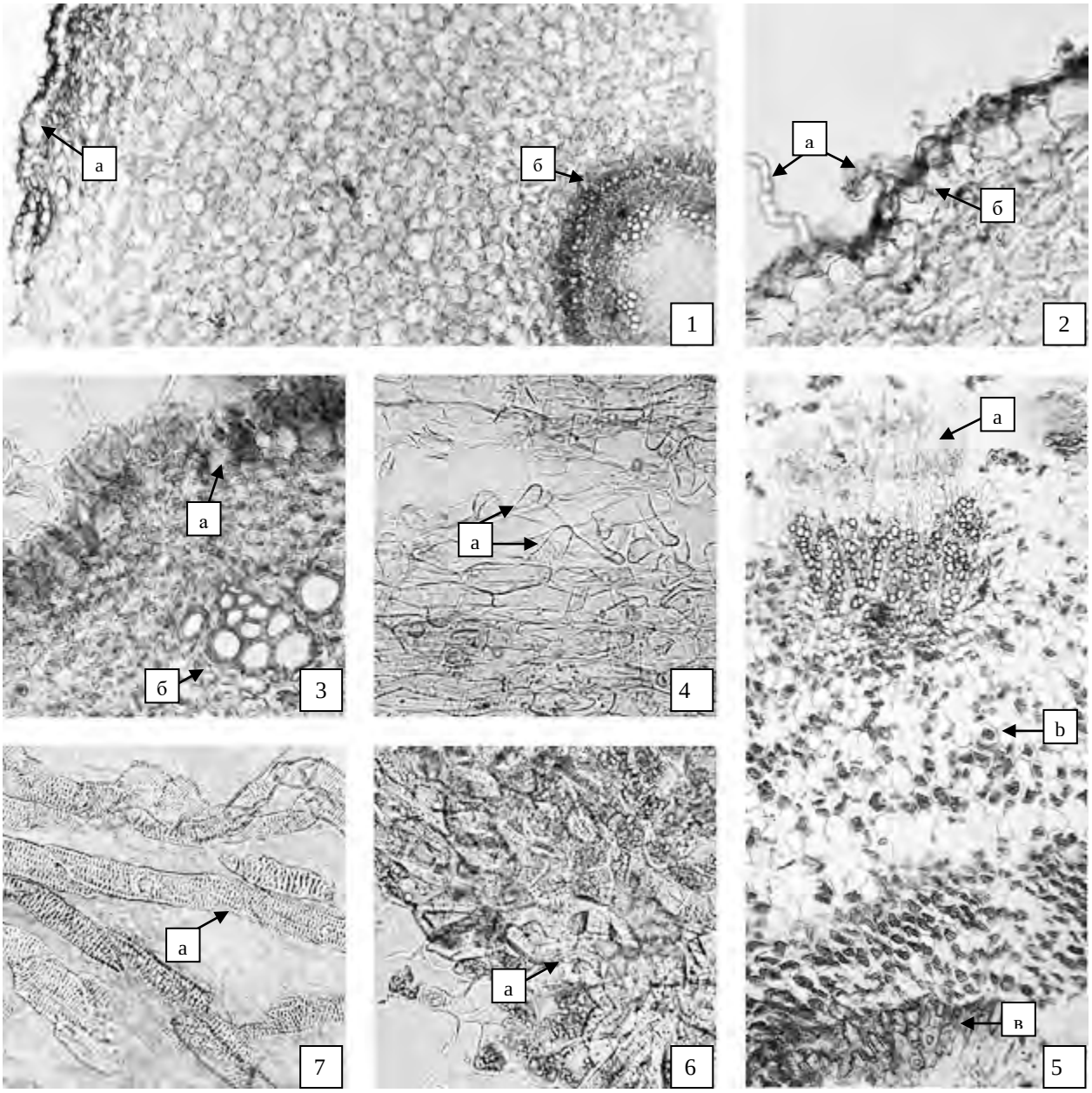


Рисунок –Валерианы лекарственной корневища с корнями.

1 –фрагмент поперечного среза корня первичного строения: а –ризодерма с прилегающей гиподермой, б– центральный осевой цилиндр (40×);
2 –фрагмент поперечного среза корня первичного строения: а –ризодерма с корневыми волосками, б– клетки гиподермы с каплями эфирного масла (200×); 3 –фрагмент поперечного среза корня первичного строения: а – клетки эндодермы, б– группа сосудов (200×);4– фрагмент корня: а – корневые волоски ризодермы (200×);5 – фрагмент поперечного среза корневища: а – сосудисто-волокнистый пучок, б– клетки паренхимы с крахмальными зернами, в– группа каменистых клеток в центре корневища (200×);6–фрагмент поперечного среза корневища: а – группа каменистых клеток (200×), 7–фрагмент корневища: а – сетчатые сосуды с короткими искривленными члениками (200×).

В сердцевине располагается группа каменистых клеток, более старые корневища полые.

В препаратах соскоба сухого сырья должны быть видны крахмальные зерна простые и 2 – 5 - сложные, круглые или неправильной формы, что характерно для корневища.

Измельченное сырье, порошок. При рассмотрении«давленого»препарата должны быть видны группы паренхимных клеток, часто с каплями эфирного масла и/или коричневым содержимым; фрагменты ризодермы с корневыми волосками; фрагменты пробки, состоящей из клеток с утолщенными стенками; фрагменты сосудов с сетчатым, сетчато-лестничным и спиральным типами вторичного утолщения стенок; фрагменты паренхимы с зернами крахмала (в растворе глицерина или воде);изредка каменистые клетки.

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) судана красного G. Около 0,0025 г судана красного G растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 6 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор СО флуоресцеина. Около 0,0025 г флуоресцеина растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 6 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около1,0 г измельченного сырья до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл спирта 96 % и кипятят с обратным холодильником на водяной бане в течение 10 мин. После охлаждения до комнатной температуры извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 20 мкл испытуемого раствора и по 5 мкл раствора СО судана красного G и раствора СО флуоресцеина. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре в течение 5 мин и помещают в камеру предварительно насыщенную в течение не менее 30 и не более 40 мин смесью растворителей ацетон–гексан (1:2), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет не менее 80–90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры и сушат до удаления следов растворителей. Затем пластинку обрабатывают анисового альдегида раствором уксуснокислым в этаноле, выдерживают в сушильном шкафу при 100–105 ºС в течение 2–3 мин и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО флуоресцеина должна обнаруживаться зона адсорбции светло-желтого цвета, на хроматограмме раствора СО судана красного G должна обнаруживаться зона адсорбции розово- или фиолетово-красного цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться 2 зоны адсорбции синего или фиолетово-синего цвета, расположенные между зонами флуоресцеина (снизу) и судана красного G (сверху) (ацетоксивалереновая и валереновая кислоты); допускается обнаружение других зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 15 %.

Золаобщая. *Цельное сырье, измельченное сырье,порошок* – не более 14 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводороднойкислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье,порошок* – не более 10 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, –не более 5 %. *Измельченное сырье:*

частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %. *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Другие части валерианы (остатки стеблей и листьев, в том числе отделенные при анализе), а также старые отмершие корневища. *Цельное сырье, измельченное сырье*– не более 5 %.

Органическая примесь*.Цельное сырье,измельченное сырье*– не более 2 %.

Минеральная примесь.*Цельное сырье* – не более 3 %, *измельченное сырье,порошок* – не более 2 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественноеопределение. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок:* экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 70 %,– не менее 25 %; суммы сесквитерпеновых кислот в пересчете на валереновую кислоту – не менее 0,12 %.

Сумма сесквитерпеновых кислот

Приготовление растворов.

Фосфорная кислота концентрированная раствор 5,0 г/л в воде. Аликвоту фосфорной кислоты концентрированной, взятую по массе или по объему, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 1000 мл, доводят водой для хроматографии до метки и перемешивают. При необходимости проводят дегазацию и фильтрацию через мембранный фильтр с размером пор не более 0,45 мкм.

Раствор СО валереновой кислоты. Около 0,005 г (точная навеска) СО валереновой кислоты растворяют в спирте 96 % в мерной колбе вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор А).

1,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают. Раствор используют без фильтрования (раствор Б).Срок годности раствора 3 мес при хранении в хорошо укупоренной упаковке, в прохладном защищенном от света месте.

Проверка пригодности хроматографической системы.

Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки должна быть не менее 4000 теоретических тарелок для пика ацетоксивалереновой кислоты и не менее 15000 для пика валереновой кислоты;
- коэффициент симметрии для пиков ацетоксивалереновой и валереновой кислот должен быть не менее 0,8 и не более 1,5.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм. Около 1,5 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 50мл спирта 96 %, присоединяют к обратному холодильнику и кипятят на водяной бане в течение 45 мин. Охлажденное до комнатной температуры извлечение фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят спиртом 96 % до метки и тщательно перемешивают.

Около2-3 мл полученного извлечения фильтруют через мембранный нейлоновый фильтр(размерпор0,45мкм), отбрасывая 1–2 мл фильтрата (испытуемый раствор).

Условия хроматографирования

Колонка	125 × 4,0 мм, сорбент октадецилсилилсиликагель(С18), 5мкм
Предколонка	4 × 4 мм, сорбент октадецилсилилсиликагель(С18), 5мкм
Подвижная фаза	**А**- ацетонитрил; **В**-фосфорной кислоты концентрированной раствор 5,0 г/л в воде.
Способэлюирования	программа градиента

Время, мин	**А,об.%**	**В,об.%**
0 – 5	47	53
5 – 7	47→50	53→50
7 – 9	50	50
9 – 16	50→60	50→40
16 – 20	60	40
20 – 25	60→100	40→0
25 – 30	100→47	0→53
30–45	47	53

Скорость потока, мл/мин	1,0
Температура колонки, °С	комнатная (20 ± 2)
Детектор	Спектрофотометрический или диодная матрица
Длина волны, нм	220
Объем вводимой пробы, мкл	10
Время хроматографирования, мин	20

Хроматографируют раствор СО валереновой кислоты, получая не менее 3 хроматограмм, и вычисляют среднее значение площади пика валереновой кислоты. Результаты считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Хроматографируют попеременно испытуемый раствор и раствор СО валереновой кислоты, получая не менее 3 хроматограмм. Расчет содержания суммы сесквитерпеновых кислот проводят методом внешнего стандарта.

Обсчету подлежат основной пик валереновой кислоты и пик ацетоксивалереновой кислоты с относительным временем удерживания 0,48 (по валереновой кислоте).

Содержание суммы сесквитерпеновых кислот в пересчете на валереновую кислоту и абсолютно сухое сырье в процентах (*X*)вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 50 \cdot P \cdot 100 \cdot 100}{S_0 \cdot 25 \cdot 10 \cdot a \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{S \cdot a_0 \cdot P \cdot 20}{S_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где *S*–площадь пика валереновой и ацетоксивалереновой кислот на хроматограмме испытуемого раствора;
a – навеска сырья, г;
a_0–навеска СО валереновой кислоты,г;
P – содержание основного вещества в СО валереновой кислоты, %;
S_0–площадь пика на хроматограмме раствора СО валереновой кислоты;
W–влажность сырья,%.

Экстрактивные вещества. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1, экстрагент –спирт 70 %).

Примечание. Сумму сесквитерпеновых кислот определяют для сырья, предназначенного для получения лекарственных растительных препаратов (пачки, фильтр-пакеты) и экстрактов; экстрактивные вещества, извлекаемые спиртом 70 %, определяют для сырья, предназначенного для получения экстрактов.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Василька синего цветки **ФС.2.5.0064.18**

Centaureae cyani flores **Взамен ГФ XI ст. 6**

Собранные в период цветения и высушенные краевые и срединные цельные цветки одно-, двухлетнего дикорастущего травянистого растения василька синего – *Centaurea cyanus* L., сем. астровых - *Asteraceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Смесь краевых и срединных цветков. Краевые цветки бесполые, воронковидные, длиной до 2 см, венчиковидные, неправильной формы, с 5 - 8 глубоко надрезанными ланцетовидными долями отгиба и трубчатым основанием длиной до 6 мм длиной. Срединные цветки - обоеполые, трубчатые, длиной около 1 см, оканчивающиеся 5 прямыми зубцами, от середины к основанию резко суженные. Тычинок 5, со свободными шерстистыми нитями и сросшимися пыльниками. Пестик с нижней завязью.

Цвет краевых цветков синий, у основания бесцветный; срединных - сине-фиолетовый. Запах характерный слабый. Вкус водного извлечения слегка пряный.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении препарата должны быть видны клетки эпидермиса краевых цветков с наружной и внутренней сторон вытянутые, с заостренными концами и извилистыми стенками. В трубчатой части цветка стенки клеток прямые или слабо волнистые. В тканях трубочки должны содержаться многочисленные призматические кристаллы оксалата кальция. Эпидермис трубчатых цветков

должен иметь аналогичную структуру, но с более мелкими клетками. Пыльца овальной формы.

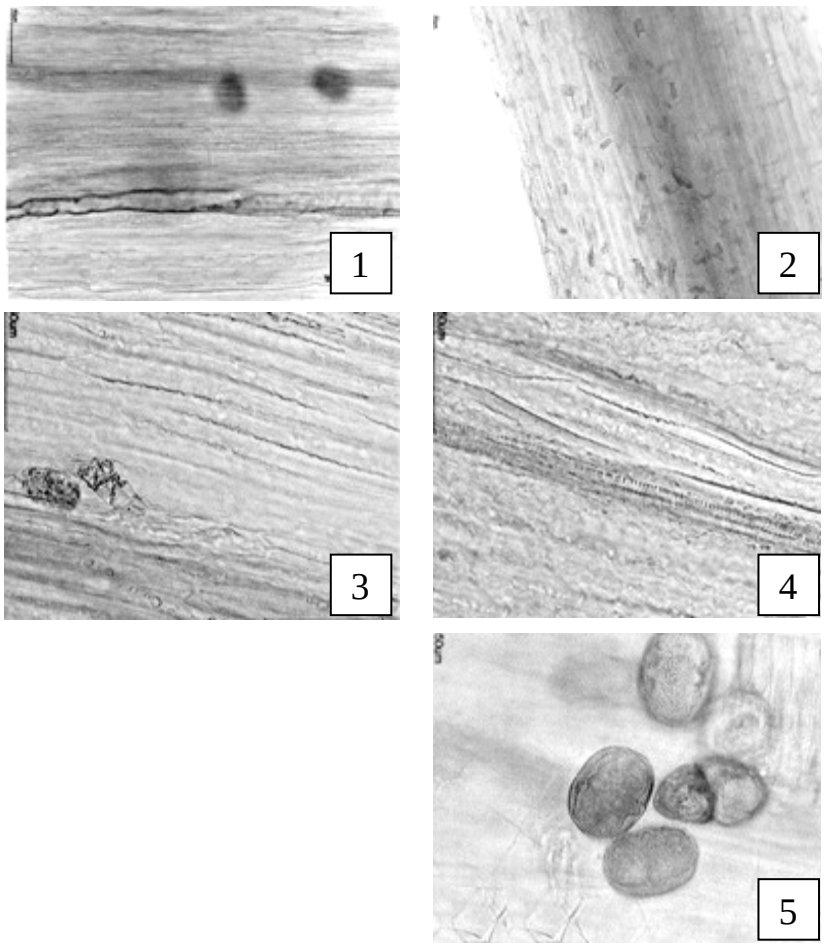


Рисунок 1 – Василька синего цветки
1 – венчик: секреторные ходы (400×), 2 – венчик: фрагмент трубки с кристаллами оксалата кальция (400×), 3 – эпидермис трубки венчика (400×); 4 – сосуды (400×); 5 – пыльцевые зерна (400×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография.

Около 0,5 г сырья, измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещают в коническую колбу со шлифом, добавляют 10 мл хлористоводородной кислоты 1 %, выдерживают

на водяной бане при температуре 40 – 45 °С в течение 30 мин. Полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр марки «красная полоса» (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 20 мкл испытуемого раствора в виде точки. Пластинку с нанесенной пробой сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 24 ч смесью растворителей бутанол – уксусная кислота ледяная – вода (4:1:2), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и просматривают в видимом свете.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции розового цвета; допускается обнаружение других зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЕ

Влажность. *Цельное сырье* - не более 14 %.

Зола общая. *Цельное сырье* - не более 8 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье* - не более 1 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Цветочных корзинок. *Цельное сырье* - не более 1 %.

Цветков, потерявших естественную окраску. *Цельное сырье* - не более 10 %.

Органической примеси. *Цельное сырье* - не более 0,5 %.

Минеральной примеси. *Цельное сырье* - не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение.

Цельное сырье. Суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3-5-дигликозид не менее 0,60 %.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм.

Около 0,3 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл хлористоводородной кислоты 1 %, выдерживают на водяной бане при температуре 40 – 45 °С в течение 15 мин. Извлечение фильтруют через вату в мерную колбу вместимостью 250 мл. Вату с сырьем помещают в коническую колбу, прибавляют 100 мл хлористоводородной кислоты 1 %, предварительно смывая частицы сырья с воронки в колбу, и повторяют экстракцию в указанных выше условиях. Затем содержимое колбы фильтруют через вату в ту же мерную колбу. Сырье на фильтре промывают 40 мл хлористоводородной кислоты 1 %. После охлаждения содержимое колбы доводят хлористоводородной кислотой 1 % до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр в колбу вместимостью 250 мл, отбрасывая первые 10 мл.

Измеряют оптическую плотность полученного фильтрата на спектрофотометре при длине волны 510 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно хлористоводородной кислоты 1 %.

Содержание суммы антоцианов в пересчете цианидин-3-5-дигликозид в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 250 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 25000}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора,

a – навеска сырья, г;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения цианидин-3-5-дигликозида при длине волны 510 нм, равный 453;

W – влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Вахты трехлистной листья	**ФС.2.5.0065.18**
Menyanthidis trifoliatae folia	**Взамен ГФ XI ст. 19**

Собранные после цветения и высушенные листья дикорастущего многолетнего травянистого растения вахты трехлистной – *Menyanthes trifoliata* L., сем. вахтовых – *Menyanthaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Цельные или частично измельченные, тонкие, голые тройчатые листья с остатками черешка длиной до 3 см. Отдельные листочки эллиптические или продолговато-обратнояйцевидные цельнокрайние или со слегка извилистым краем длиной 4 – 10 см, шириной 2,5 – 7 см. Листья с коричневатыми или красноватыми водяными устьицами (гидатодами), хорошо заметными под лупой.

Цвет с верхней стороны листовых пластинок зеленый или темно-зеленый, с нижней стороны зеленый или светло-зеленый; цвет черешков зеленый. Запах слабый характерный, вкус водного извлечения очень горький.

Измельченное сырье. Смесь кусочков различной формы, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.

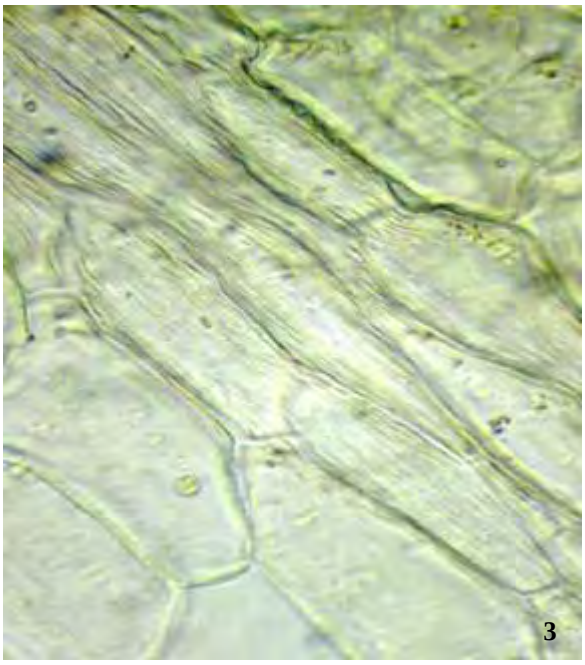
Цвет от светло-зеленого до темно-зеленого. Запах слабый характерный, вкус водного извлечения очень горький.

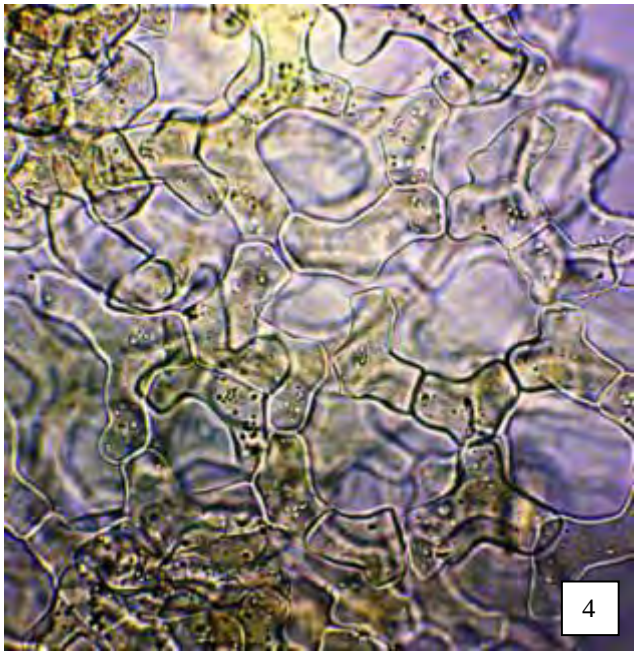
Микроскопические признаки. *Цельное сырьё, измельченное сырьё.* При рассмотрении микропрепарата листа с поверхности должны быть видны клетки верхнего эпидермиса, которые имеют многоугольную форму; клетки нижнего эпидермиса со слабоизвилистыми стенками. На обеих сторонах листа, преимущественно на нижней, имеются погруженные устьица, окруженные 4 – 7 клетками эпидермиса (аномоцитный тип). Вокруг устьиц заметна лучистая складчатость кутикулы. С нижней стороны листа под

эпидермисом видна аэренхима с большими воздухоносными полостями. Клетки эпидермиса черешка прозенхимной формы. Проводящая система представлена открытыми коллатеральными пучками.









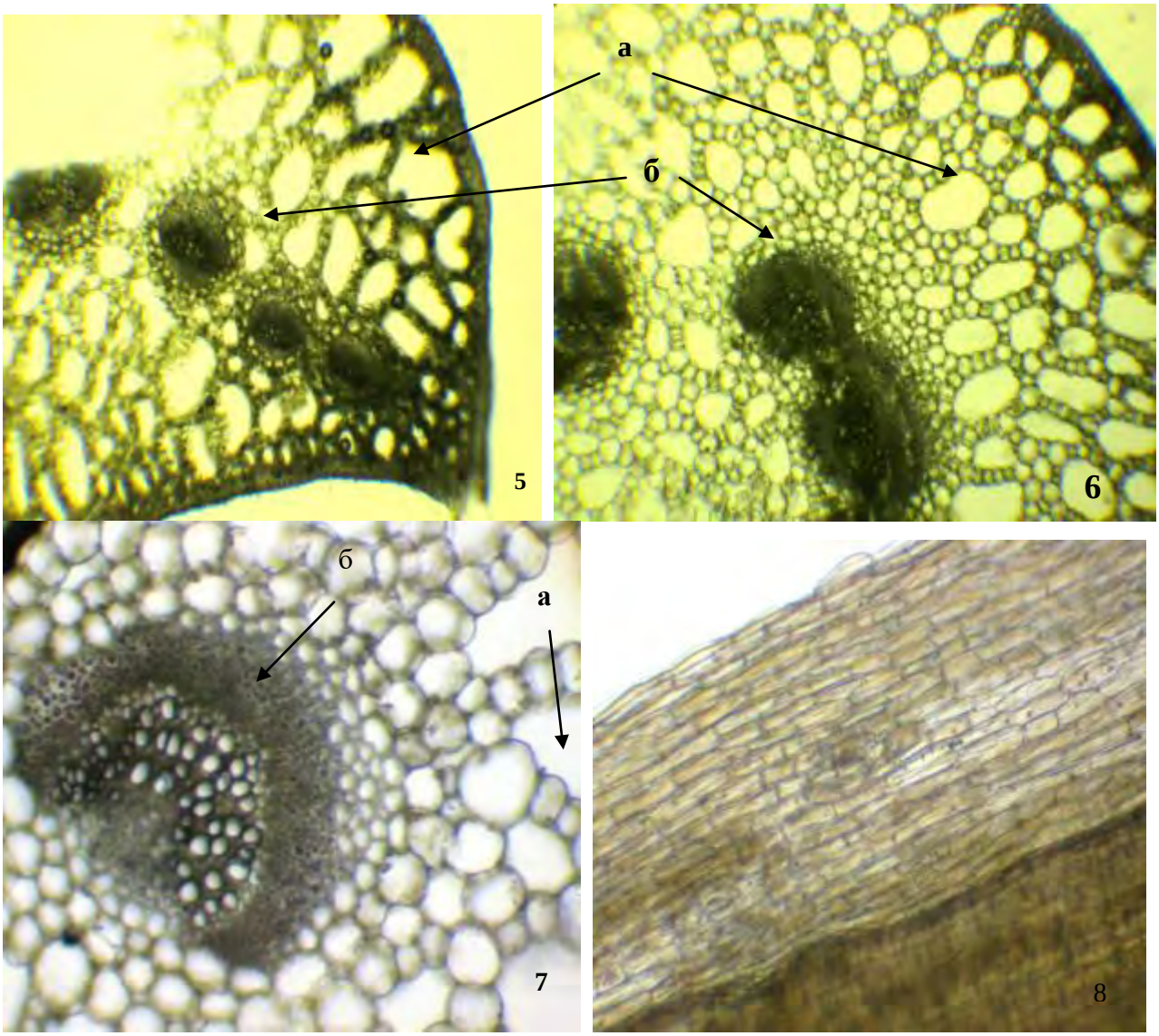


Рисунок – Вахты трехлистной листья
1 – фрагмент эпидермиса верхней стороны листа (200×): а - устьица аномоцитного типа, 2 – фрагмент эпидермиса нижней стороны листа (200×): а – устьица аномоцитного типа, 3 – фрагмент эпидермиса со складчатостью кутикулы (400×), 4 – аэренхима с воздухоносными полостями (400×), 5, 6, 7, – фрагмент поперечного среза черешка (200×, 200×, 400×): а – воздухоносные полости, б – открытые коллатеральные пучки, 8 – фрагмент эпидермиса черешка (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Ванилина раствор 3 %. 3,0 г ванилина растворяют в 100 мл спирта 96 % и осторожно по каплям добавляют 0,5 мл серной кислоты концентрированной. Раствор используют свежеприготовленным.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г измельченного сырья помещают в колбу со шлифом, прибавляют 10 мл спирта 96 % и нагревают при перемешивании на водяной бане при температуре 60 °С в течение 5 мин. Охлаждают и выпаривают при температуре 60 °С на роторном испарителе при пониженном давлении досуха. Сухой остаток растворяют в 2 мл спирта 96 % (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором наносят 30 мкл (0,03 мл) испытуемого раствора. Пластинку с нанесенной пробой помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 2 ч смесью растворителей: вода – спирта 96 % – этилацетат (2 : 10 : 85,5), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 - 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, опрыскивают ванилина раствором 3 %, выдерживают при температуре 100 – 105 °С в течение 10 мин и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться доминирующая зона адсорбции сероватого или серовато-фиолетового цвета; допускается обнаружение других зон адсорбции синего цвета, серовато-синего цвета, коричневого цвета (иридоиды).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 14 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 10 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 2 %.

Измельченность сырья. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Листья, изменившие окраску (пожелтевшие, потемневшие и почерневшие). *Цельное сырье* – не более 5 %.

Кусочки листьев, изменивших окраску (потемневшие и почерневшие). *Измельченное сырье* – не более 5 %.

Листьев с черешками длиннее 3 см. *Цельное сырье* – не более 8 %.

Отдельных черешков. *Цельное сырье* – не более 3 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье* – не более 1 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырьё, измельченное сырье:* суммы флавонолов в пересчете на рутин – не менее 1 %.

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) рутина. Около 0,1 г (точная навеска) СО рутина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в спирте 70 %, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают. Срок годности раствора 1 мес.

5,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивают.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в пакет из фильтровальной бумаги и экстрагируют хлороформом в аппарате Сокслета в течение 14 ч до обесцвечивания (20 сливов). Пакет сушат на воздухе до удаления следов хлороформа. Навеску ко-

личественно переносят в коническую колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 10 мл спирта 70 % и нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Извлечение фильтруют в колбу вместимостью 50 мл, избегая попадания частиц сырья на фильтр. Экстракцию в указанных выше условиях повторяют дважды порциями по 10 мл спирта 70 %. Полученные извлечения объединяют, упаривают на водяной бане при температуре 70 °С на роторном испарителе при пониженном давлении до объема 6 – 7 мл, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (испытуемый раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 1 мл стрептоцида раствора 0,5 % в серной кислоты растворе 10 %, прибавляют 2 мл натрия нитрита раствора 0,2 %, перемешивают в течение 2 мин, прибавляют 1,0 мл раствора А и 1 мл натрия гидроксида раствора 10 %, перемешивают в течение 1 мин, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (испытуемый раствор Б).

Через 15 мин измеряют оптическую плотность испытуемого раствора Б на спектрофотометре при длине волны 432 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения. В качестве раствора сравнения используют испытуемый раствор А, разбавленный спиртом 96 % в 25 раз (без добавления реактивов).

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора СО рутина, полученного аналогично испытуемому раствору, на спектрофотометре при длине волны 432 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения. В качестве раствора сравнения используют раствор СО рутина, разбавленный спиртом 96 % в 25 раз (без добавления реактивов).

Содержание суммы флавонолов в пересчете на рутин в абсолютно сухом сырье в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{\mathrm{A} \cdot \mathrm{a_0} \cdot 5 \cdot 10 \cdot 25 \cdot 100 \cdot \mathrm{P}}{\mathrm{A_0} \cdot \mathrm{a} \cdot 25 \cdot 25 \cdot 1 \cdot (100 - W)} = \frac{\mathrm{A} \cdot \mathrm{a_0} \cdot \mathrm{P} \cdot 200}{\mathrm{A_0} \cdot \mathrm{a} \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора Б;
$\mathrm{A_0}$ – оптическая плотность раствора СО рутина;

a_o – навеска СО рутина, г;
a – навеска сырья, г;
P – содержание основного вещества в СО рутина, %;
W – влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Гинкго двулопастноголистья **ФС.2.5.0010.15**

Ginkgo biloba folia

Собранные в течение вегетационного периода и высушенные листья многолетнего культивируемого древесного растениягинкго двулопастного – *Ginkgo biloba* L., сем.гинкговых – *Ginkgoaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.*Цельные или частично измельченные черешковые листья без прилистников светло-зелёного, желтовато-зеленого или желтого цвета, в очертании листовой пластинки веерообразные, на верхушке двулопастные с дихотомическим жилкованием и низбегающим основанием, кожистые, голые, слегка гофрированные по краю. Размер листьев варьирует от 4 до 10 см. Изредка встречаются части укороченных побегов. Листовая пластинка рассечена и имеет сверху глубокий V-образный вырез, рассекающий пластинку на 2 симметричные половинки.

Запах характерный. Вкус водного извлечения специфический, кисловатый, слегка вяжущий с горьким послевкусием.

Измельченное сырье. При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) виднымусочки цельнокрайних листовых пластинок, черешков различной величины и формы, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет сырья зелёный, желтовато-зеленый или желтый.

Запах характерный. Вкус водного извлечения специфический, кисловатый, слегка вяжущий с горьким послевкусием.

Микроскопические признаки. *Цельное и измельченное сырье.*При рассмотрении листа с поверхности должны быть видны клетки верхнего и нижнего эпидермиса неправильной, вытянутой формы, клетки верхнего эпидермиса с сильноизвилистым краем и четковидно-утолщенными стенками; устьица встречаются только на нижней стороне листа и расположены группами по 2–4, замыкающие клетки устьиц содержат крахмал. На поперечном срезе листовой пластинки видна кутикула с обеих сторон листа. Под эпидермисом находится мезофилл. Мезофилл состоит из однотипных паренхимных клеток округлой, изодиаметрической формы с небольшими межклетниками; содержит хлоропласты, крахмальные зерна, вместилища. Клетки эпидермиса черешка листа, расположенные над жилкой прозенхимной формы, сильно вытянутые вдоль жилки, а между жилками – паренхимные. Под эпидермисом находится 2-3-слойная гиподерма, состоящая из плотно сомкнутых клеток с сильно утолщенными одревесневшими оболочками. На поперечном срезе черешка видны 2 пучка, ограниченные клетками паренхимы, а также вместилища; клетки хлоренхимы черешка округлой изодиаметрической формы. На продольном срезе черешка в основной паренхиме видны крупные друзы, а между гиподермой и ксилемой – друзы небольшого размера. Ксилема черешка представлена кольчатыми сосудами и сосудами с окаймленными порами.

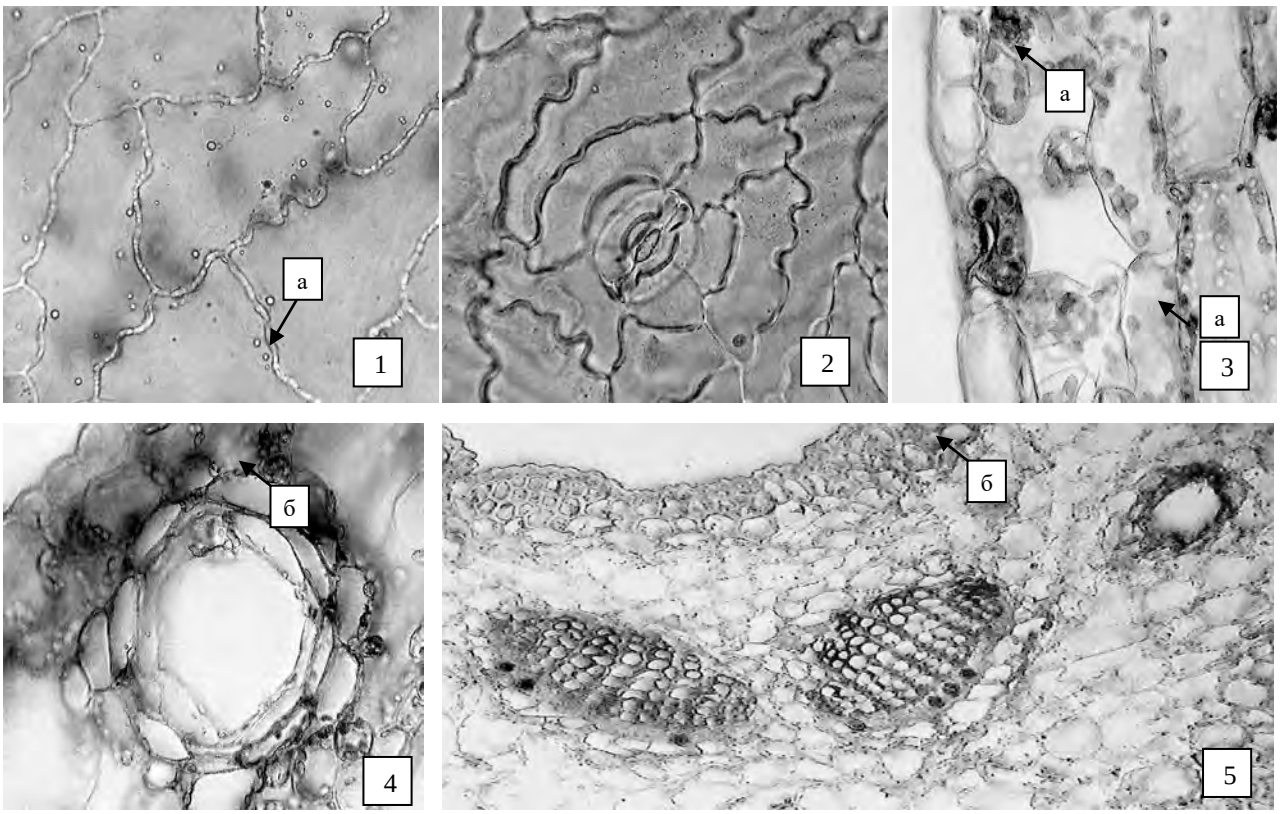


Рисунок – Гинкго двулопастного листья.

1 – фрагмент верхнего эпидермиса (400×); 2 – фрагмент нижнего эпидермиса с устьицами аномоцитного типа (400×); 3 – фрагмент продольного среза листовой пластины с устьичным комплексом (а) (400×); 4 – фрагмент поперечного среза листовой пластины: выстилающие клетки (а), полость вместилища (б) (400×); 5 – фрагмент радиального среза черешка листа: смоляной ход (а), проводящий пучок (б) (100×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

На линию старта аналитической хроматографической пластинкисо слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором наносят 10 мкл испытуемого раствора (см. раздел «Количественное определение» приготовление раствора А испытуемого раствора)и 10 мкл раствора стандартного образца (СО) рутина(см. раздел «Количественное определение» приготовление раствора А СОрутина).Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 24 чсмесью растворителей хлороформ–метанол–вода

(26:14:3), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет80–90 % длины пластинки от линии старта,ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителейи просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм.

На хроматограмме раствораСОрутина зона адсорбции темно-коричневого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться 2 зоны адсорбции темно-коричневогоцвета, расположенные выше зоны адсорбции СО рутина; допускается обнаружение других зон адсорбции.

Затем пластинку обрабатывают раствором диазореактива и просматривают придневном свете.

На хроматограмме раствораСОрутина зона адсорбции желто-оранжевого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться 2 зоны адсорбции желто-оранжевого цвета, расположенные выше зоны адсорбции СО рутина; допускается обнаружение других зон адсорбции (флавоноиды).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность.*Цельное сырье,измельченное сырье*–не более 12 %.

Зола общая.*Цельное сырье,измельченное сырье*–не более 10 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте.*Цельное сырье, измельченное сырье*–не более 5 %.

Измельченность сырья.*Цельное сырье:*частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, –не более 5 %. *Измельченное сырье:*частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиямиразмером 7 мм, –не более

5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиямиразмером 0,5 мм, –не более 5 %.

Посторонние примеси

Части укороченных побегов.*Цельное сырье*–не более 2 %.

Органическая примесь.*Цельное сырье,измельченное сырье*–не более 0,5 %.

Минеральная примесь.*Цельное сырье, измельченное сырье*–не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье:*сумма флавоноидов в пересчете на рутин –не менее 0,5 %.

Приготовление растворов.

*Раствор СОрутина.*Около 0,025 г (точная навеска) предварительно высушенного до постоянной массы при температуре 100–105°ССО рутина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 30 мл спирта 70 % при нагревании на водяной бане. После охлаждения до комнатной температуры содержимое колбы доводят спиртом 70 % до метки и перемешивают (раствор АСОрутина). Срок годности растворане более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

1,0 мл раствора АСО рутина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 1 мл алюминия хлорида раствора 2 % в спирте 96 %и 1 каплю уксусной кислоты разведенной 30 %, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б СО рутина). Срок годности раствора 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.Около 1,0 г(точная

навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью100 мл, приливают 30 мл спирта 70% и взвешивают с точностью до ±0,01 г. Колбу с содержимым присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане в течение 1 ч. После охлаждения до комнатной температуры колбу взвешивают, доводят ее содержимое спиртом 70% до первоначальной массы, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр «красная лента» (раствор А испытуемого раствора).

1,0 мл раствора А испытуемого растворапомещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл алюминия хлорида раствора 2 % в спирте 96 %и 1 каплю уксусной кислоты разведенной 30 %, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (растворБиспытуемого раствора).

Оптическую плотность раствора Биспытуемого растворазмеряютчерез 40 мин на спектрофотометре при длине волны 406 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл раствора А испытуемого раствора,1 капли уксусной кислоты разведенной 30 %, доведенный спиртом 96 %до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО рутина. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл раствора А СО рутина,1 капли уксусной кислоты разведенной 30 %, доведенный спиртом 96 %до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете нарутини абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 30 \cdot 25 \cdot P \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot 50 \cdot 25 \cdot a \cdot 1 \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot a_0 \cdot P \cdot 60}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Биспытуемого раствора;
$A_о$ – оптическая плотность раствора Б СО рутина;
a – навеска сырья, г;
$a_о$ – навеска СО рутина, г;
P – содержание основного вещества в СО рутина, %;
W – влажность сырья, %.

Допускаетсясодержания суммы флавоноидов в пересчете нарутинвычислять с использованием удельного показателя поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 30 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot 25 \cdot a \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 3000}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где*A*- оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;

$A_{1см}^{1\%}$ –удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при длине волны 406 нм, равный 190;

a– навеска сырья, г;

W– влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Горицвета весеннего трава **ФС.2.5.0066.18**

Adonis vernalis herbae **Взамен ГФ XI ст. 43**

Собранная в период цветения до начала осыпания плодов и высушенная трава дикорастущего многолетнего травянистого растения горицвета весеннего (адониса весеннего) – *Adonis vernalis* L., семейства лютиковых – *Ranunculaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Цельные или частично измельченные олиственные стебли с цветками или без них, реже с бутонами или плодами разной степени развития, иногда частично осыпавшимися. Стебли, срезанные выше бурых низовых чешуевидных листьев, длиной 10-35 см, толщиной до 0,4 см, просты или маловетвистые. Листья очередные, сидячие, полустеблеобъемлющие, в общем очертании округлые или широкоовальные, пальчаторассеченные на 5 долей, из которых 2 нижних - перисторассеченные, три верхних – дважды перисторассеченные; доли листьев линейные, у верхушки шиловидно-заостренные, цельнокрайние, длиной 0,5 – 2 см, шириной 0,5 – 1 мм. Листья, собранные после отцветания, жестковатые. Цветки одиночные на верхушке стеблей, правильные, около 3,5 см в поперечнике, свободнолепестные, с 5 – 8 чашелистиками, с 15 – 20 лепестками, с многочисленными тычинками и пестиками. Чашелистики яйцевидные, вверху притупленные с редкими зубцами, опушенные, длиной 12 – 20 мм, шириной около 12 мм, легко опадающие. Лепестки продолговато-эллиптическите, на верхущке суженные, зазубренные. Плод сборный, овальный, состоит из многочисленных сухих орешков, сидящих на цилиндрическом буроватом цвето-

ложе. Орешки длиной 3,5 – 5,5 мм, шириной около 3 мм, овальные с коротким клювообразно загнутым столбиком, морщинисто-ячеистые, опушенные.

Цвет стеблей и листьев зеленый, цветков – золотисто-желтый, плодов – серовато-зеленый. Запах слабый. Вкус не определяется.

Измельченное сырье. Смесь кусочков стеблей, листьев, частей цветков и плодов, проходящая сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет кусочков стеблей и листьев зеленый, цветков – золотисто-желтый. Запах слабый. Вкус не определяется.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье. Измельченное сырье.*

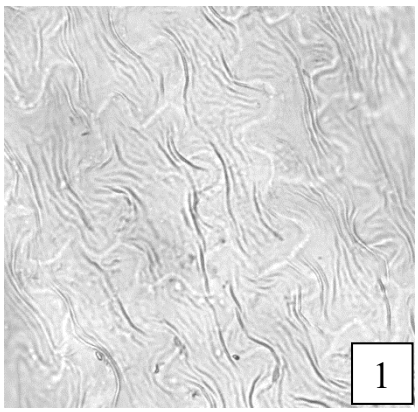
При рассмотрении препарата листа с поверхности с обеих сторон должны быть видны крупные клетки эпидермиса с сильноизвилистыми стенками, несколько вытянуты по длине дольки. Клетки эпидермиса иногда имеют четковидные утолщения. Кутикула с ясно выраженной продольной, волнистой складчатостью. Устьица только на нижней стороне, крупные, овальные, слегка выступающие над поверхностью листа, окружены 4-5 клетками эпидермиса (аномоцитный тип) и ориентированы вдоль пластинки листа. По краю долек листа и у основания изредка встречаются одноклеточные волоски двух типов: длинные, лентовидные с закругленной верхушкой, суженные у основания, и короткие булавовидные волоски, резко суженные у места прикрепления. Все волоски со спирально-складчатой кутикулой, прикреплены к очень маленькой округлой клетке эпидермиса.

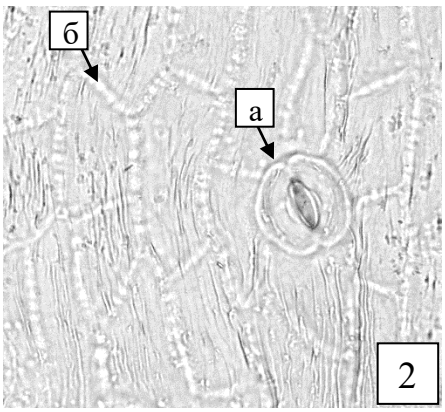
При рассмотрении чашелистиков с поверхности должны быть видны прямоугольные вытянутые клетки эпидермиса с прямыми или слегка извилистыми стенками и с выраженной продольной, волнистой складчатостью кутикулы, иногда с четковидным утолщением. Устьица аномоцитного типа расположены с наружной стороны, ориентированы вдоль чашелистика. По всей поверхности встречаются характерные для данного вида сырья волоски. Длинные, лентовидные волоски иногда прикреплены к эпидермису в виде пучка, по 2-3 волоска. В мезофилле чашелистиков встречаются одиночные призматические кристаллы оксалата кальция и сферокристаллы. Эпидермис

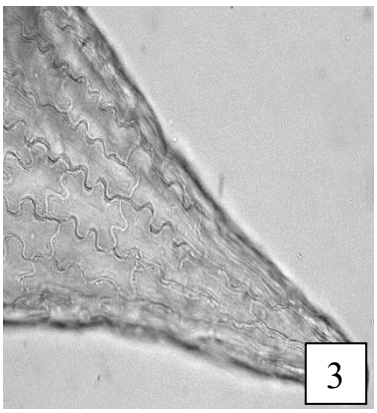
лепестков представлен прямоугольно-вытянутыми клетками с извилистыми стенками. Обнаруживаются пыльцевые зерна округлой формы с тремя порами.

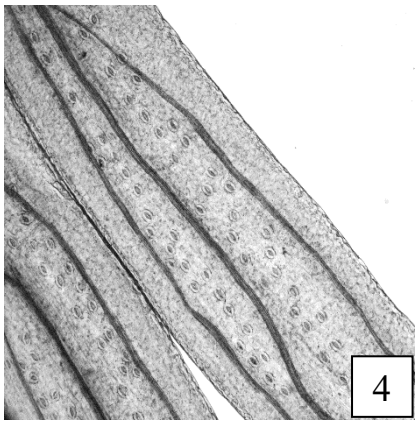
В «давленом» препарате плода должны быть видны толстостенные с четковидным утолщением клетки экзокарпия. Кутикула с ясно выраженной волнистой складчатостью. Волоски простые, одноклеточные со спирально-складчатой кутикулой. В месте прикрепления волоска эпидермальные клетки с лучисто-морщинистой кутикулой образуют розетку. Волоски прикрепляются по одному или по 2-3. Встречаются пласты и отдельные склереиды. Эндокарпий представлен полигональными клетками. Эндосперм состоит многоугольных клеток, заполненных алейроновыми зернами и каплями жирного масла.

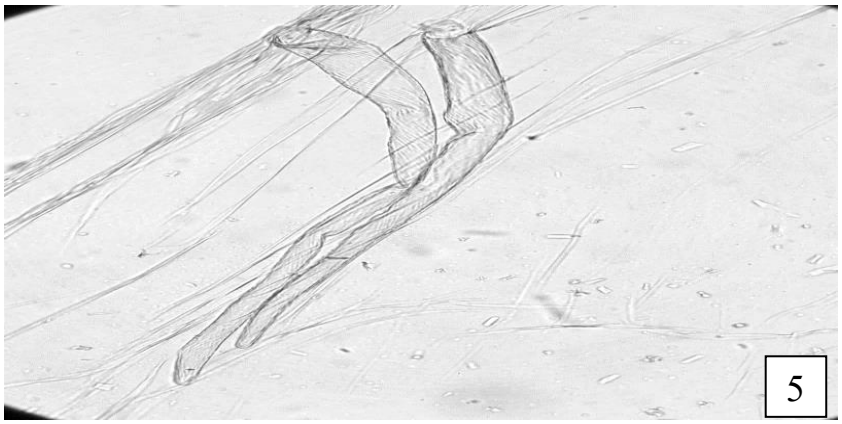
В «давленом» препарате стебля должны быть видны прямоугольные вытянутые клетки эпидермиса с прямыми стенками, иногда с четковидным утолщением. Устьица аномоцитного типа ориентированы вдоль стебля. Эпидермис имеет выраженную продольную, волнистую складчатостью кутикулы в местах расположения устьиц. Паренхима сердцевины состоит из продолговатых клеток с утолщенными пористыми оболочками. Проводящая система представлена спиральными, лестничными и сетчатыми сосудами.

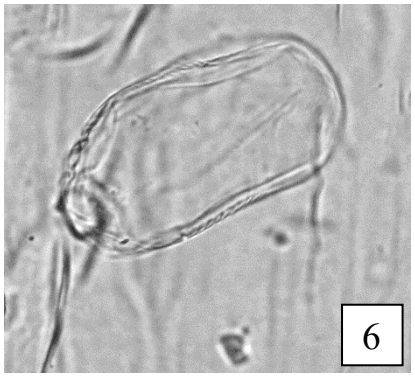

1

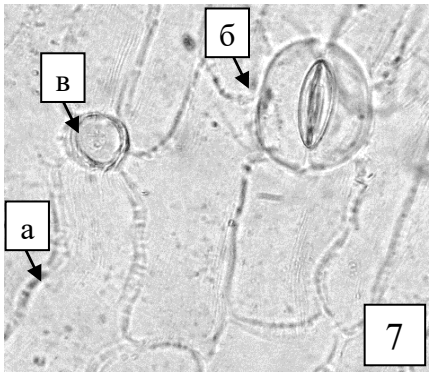

б
а
2

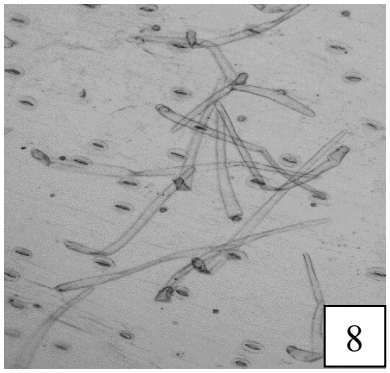

3

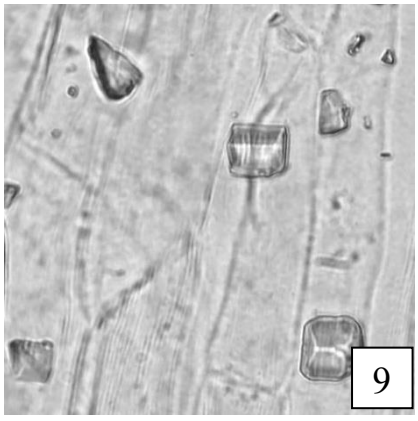

4

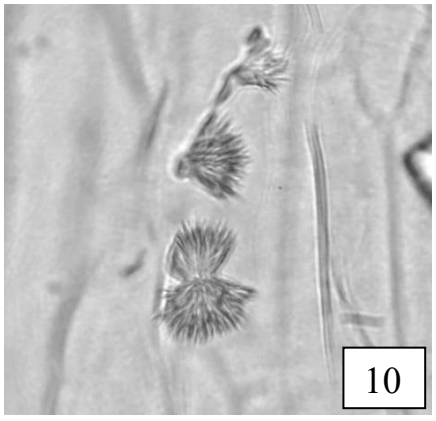

5

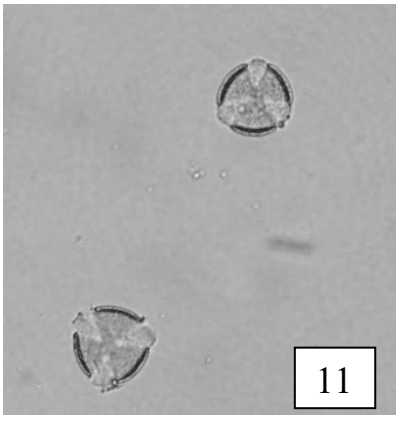

6


б
в
а
7


8


9


10


11

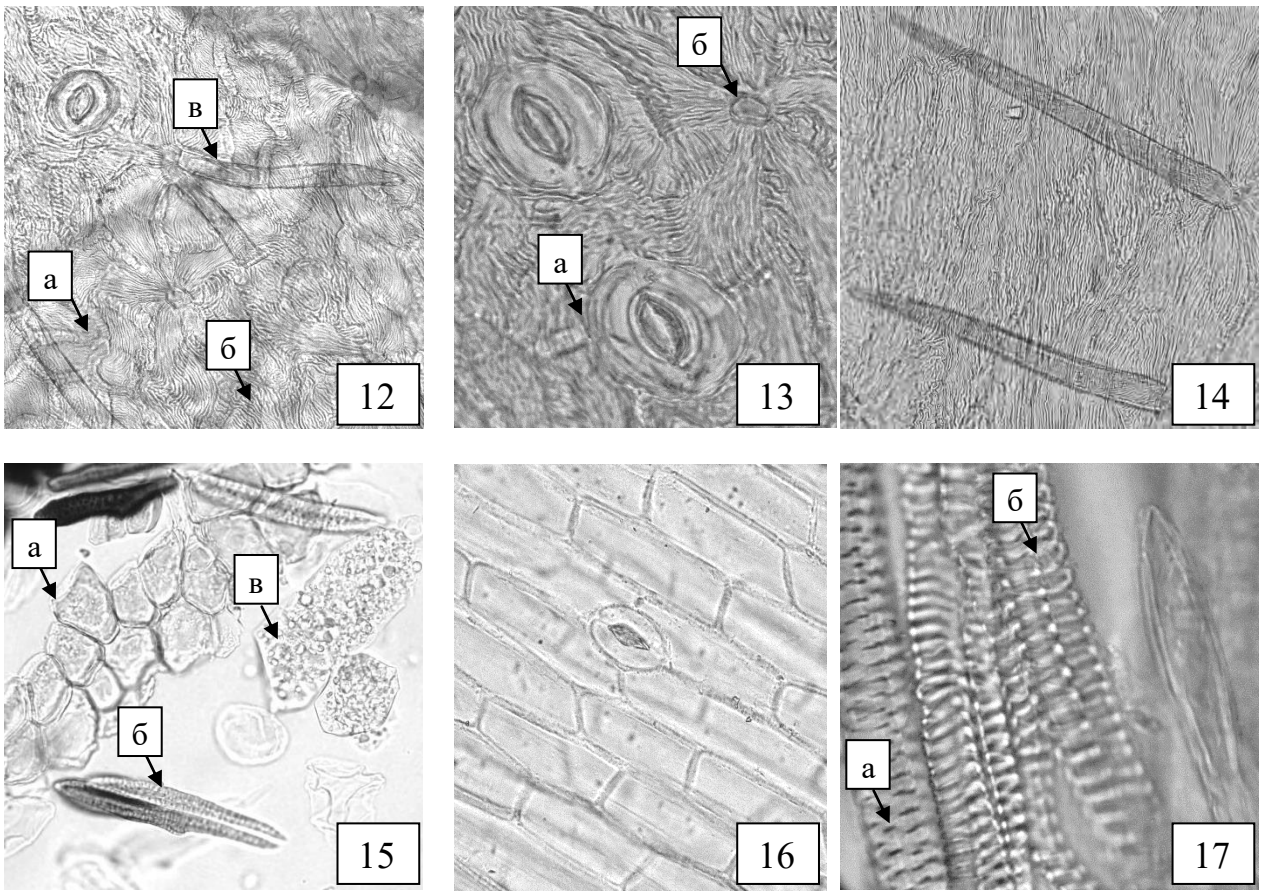


Рисунок – Горицвета весеннего трава

1 – фрагмент эпидермиса листа с сильноизвилистыми стенками и складчатостью кутикулы (200×); 2 – фрагмент эпидермиса листа(200×): а - устьице аномоцитного типа, б - четковидное утолщение стенок; 3 – верхушка доли листа (200×); 4 – фрагмент эпидермиса с устьицами ориентированными вдоль пластинки листа (40×); 5 – простые одноклеточные волоски с спирально-складчатой кутикулой (200×); 6 – булавовидный волосок (400×); 7 – фрагмент эпидермиса чашелистика с четковидным утолщением (а), устьицем аномоцитного типа (б) и местом прикрепления волоска (в) (400×); 8 – фрагмент эпидермиса с простыми одноклеточными волосками и устьицами ориентированными вдоль чашелистика («давленый» препарат) (200×); 9 – призматические кристаллы оксалата кальция (400×); 10 – сферокристаллы оксалата кальция (400×); 11 – пыльца (200×); 12 – фрагмент эпидермиса плода(200×): а - толстостенные клетки с четковидным утолщением, б - складчатость кутикулы, в - пучковидный волосок; 13 – фрагмент эпидермиса плода(400×):а - устьице аномоцитного типа, б - место прикрепления волоска; 14 – фрагмент эпидермиса плода: одиночные простые волоски (200×); 15 – фрагмент эпидермиса плода («давленый» препарат) (200×):а - эндокарпий, б - каменистые клетки, в - клетки эндосперма с крахмалом и каплями жирного масла; 16 – фрагмент эпидермиса стебля с прямоугольными вытянутыми

клетками и устьицем аномоцитного типа (200×); 17 – сетчатые (а) и спиральные сосуды стебля (б) (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Приготовление растворов
Натрия нитропруссида раствор 0,5 %.
Раствор 5 г/л.

Качественные реакции

1 мл раствора А или 1 мл раствора Б, приготовленных для испытания по показателю «Биологическая активность», разбавляют 2 мл воды. К 1 мл полученного раствора прибавляют 2 капли натрия нитропруссида раствора 0,5 % и 3 капли натрия гидроксида раствора 10 %; должно наблюдаться коричневато-желтое окрашивание, которое затем переходит в желтое (сердечные гликозиды).

К 1 капле раствора А или раствора Б прибавляют 8 капель серной кислоты концентрированной; должно наблюдаться темно-красное окрашивание (сердечные гликозиды).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 13 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 12 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 5 %.

Растений со стеблями, имеющими бурые чешуйчатые листья. *Цельное сырье* – не более 2 %.

Измельченность сырья. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,25 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Потемневших частей растения. *Цельное сырье* – не более 3 %.

Растений со стеблями, имеющими бурые чешуйчатые листья. *Цельное сырье* – не более 2 %.

Органической примеси. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 2 %.

Минеральной примеси. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье.* Биологическая активность 1 г должна быть 50 - 66 ЛЕД. *Измельченное сырье.* Биологическая активность 1 г должна быть 50 - 66 ЛЕД.

Биологическая активность. Активность цельного сырья, измельченного сырья определяют биологическим методом на лягушках по сравнению со стандартным образцом (СО) цимарина в соответствии с требованиями ОФС «Биологические методы оценки активности лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов, содержащих сердечные гликозиды».

Испытание на лягушках. Испытание проводят на травяных лягушках, вводя растворы в лимфатические бедренные мешки (под кожу) или в сердце (в полость желудочка), или на водяных лягушках, вводя раствор под кожу, в полость желудочка или в вену. Стандартный и испытуемый образцы готовят в день опыта.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, и сушат в сушильном шкафу в течение 2 ч при температуре 40 - 60 °С.

Извлечение из травы горицвета готовят в зависимости от способа введения.

Для подкожного введения 5 г измельченного и высушенного сырья экстрагируют 110 мл спирта 95 % в аппарате Сокслета в течение 6-8 ч. извлечение собирают в цилиндр вместимостью100 мл и доводят объем спиртом 95 % до метки (1 : 20) (раствор А).

Для внутрисердечного и внутривенного введения 5 г измельченного и высушенного сырья помещают в колбу с притертой пробкой вместимостью 500 мл, прибавляют 110 мл 75 % спирта (по объему) и оставляют на сутки. Затем к колбе присоединяют обратный холодильник, помещают колбу на кипящую водяную баню и экстрагируют в течение 1 ч. Извлечение охлаждают, фильтруют в цилиндр вместимостью 100 мл через четырехслойный фильтр из марли и доводят объем 75 % спиртом до метки (1 : 20) (раствор Б). Срок годности раствора Б 2 суток со дня приготовления.

Стандартный и испытуемый растворы готовят в день опыта.

К 2 мл раствора цимарина 1 : 3333 прибавляют 6 мл воды (1 : 4).

20 мл раствора А/Б выпаривают на кипящей водяной бане до 2 мл и доводят объем водой до 20 мл. Образующуюся при этом муть или осадок не отфильтровывают, а прибавляют 1-2 капли натрия гидрокарбоната раствора 5 %. Полученное таким образом спиртоводное извлечение (1 : 20) испытывают на лягушках.

Определив наименьшие дозы стандартного и испытуемого растворов, вызывающих систолическую остановку сердца у большинства лягушек (в миллилитрах на массу травяной лягушки или в миллилитрах на 1 г массы водяной лягушки), вычисляют содержание ЛЕД в 1 г травы горицвета.

Активность горицвета весеннего травы контролируется ежегодно.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Горца перечного трава	**ФС.2.5.0067.18**
Polygoni hydropiperis herba	**Взамен ГФ XI ст. 57**

Собранная в фазу цветения высушенная трава дикорастущего однолетнего растения горца перечного (водяного перца) – *Polygonum hydropiper* L. сем. гречишных – *Polygonaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Цельные или частично измельченные цветоносные олиственные побеги длиной до 45 см без грубых нижних частей, с плодами различной степени зрелости. Стебли цилиндрические, утолщенные в узлах. Листья очередные, короткочерешковые, продолговато-ланцетные, голые, с заостренной или притупленной верхушкой и цельным краем. Длина листьев 7 - 9 см, ширина до 1,8 см. У основания черешка находятся видоизмененные сросшиеся прилистники – раструбы. Раструбы пленчатые, часто с коричневато-красным оттенком, длиной до 1,5 см, плотно прилегают к стеблю. Поверхность раструбов голая, по верхнему краю заметны короткие щетинки до 2 мм длиной. Соцветия – тонкие прерывистые поникающие кисти длиной до 6 см. Цветки на коротких цветоножках; околоцветник простой, длиной 3 – 4 мм, с 4 – 6 туповатыми долями, заметны многочисленные буроватые точки (вместилища). Тычинок 6 (8), пестик с верхней одногнездной завязью и 2 – 3 столбиками. Плод – яйцевидно-эллиптический орешек, с одной стороны

плоский, другой – выпуклый, при созревании остается заключенным в околоцветник.

Цвет стеблей – зеленоватый, часто с красновато-коричневым оттенком, листьев – зеленый, раструбов – красноватый, цветков – розоватый, плодов – черный. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения слегка жгучий.

Измельчённое сырье. Кусочки листьев, стеблей и соцветий различной формы, отдельные цветки и плоды, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет зеленый с красновато-коричневым оттенком. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения слегка жгучий.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении листа с поверхности должны быть видны клетки эпидермиса верхней стороны листа с прямыми стенками и складчатой кутикулой и нижней стороны – с извилистыми стенками; устьица аномоцитного типа, встречающиеся с обеих сторон листа; мелкие бесцветные или светло-бурые железки с 2-клеточным (реже 4-клеточным) основанием и 4-клеточной (реже 2- или 6-клеточной) головкой. По краю листовой пластинки и по жилке с нижней стороны должны быть видны конусовидные пучковые волоски, состоящие из нескольких сросшихся клеток. В мезофилле листа должны быть видны многочисленные крупные друзы кальция оксалата и округлые или овальные схизогенные вместилища с содержимым светло-бурого, бурого или желтовато-зеленого цвета.

При рассмотрении давленого препарата стебля видны клетки эпидермиса удлиненно-прямоугольной формы с прямыми стенками, устьица аномоцитного типа, редкие. В состав проводящих пучков входят спиральные, кольчатые и сетчатые сосуды; встречаются друзы и вместилища. При рассмотрении препаратов околоцветника, раструба и эпидермы стеблей с поверхности также должны быть видны железки. По краю раструба видны пучковые волоски большей длины, чем по краю листовой пластинки.

Погруженные схизогенные вместилища, заметны во всех надземных органах – листьях, стеблях, раструбах и околоцветнике.

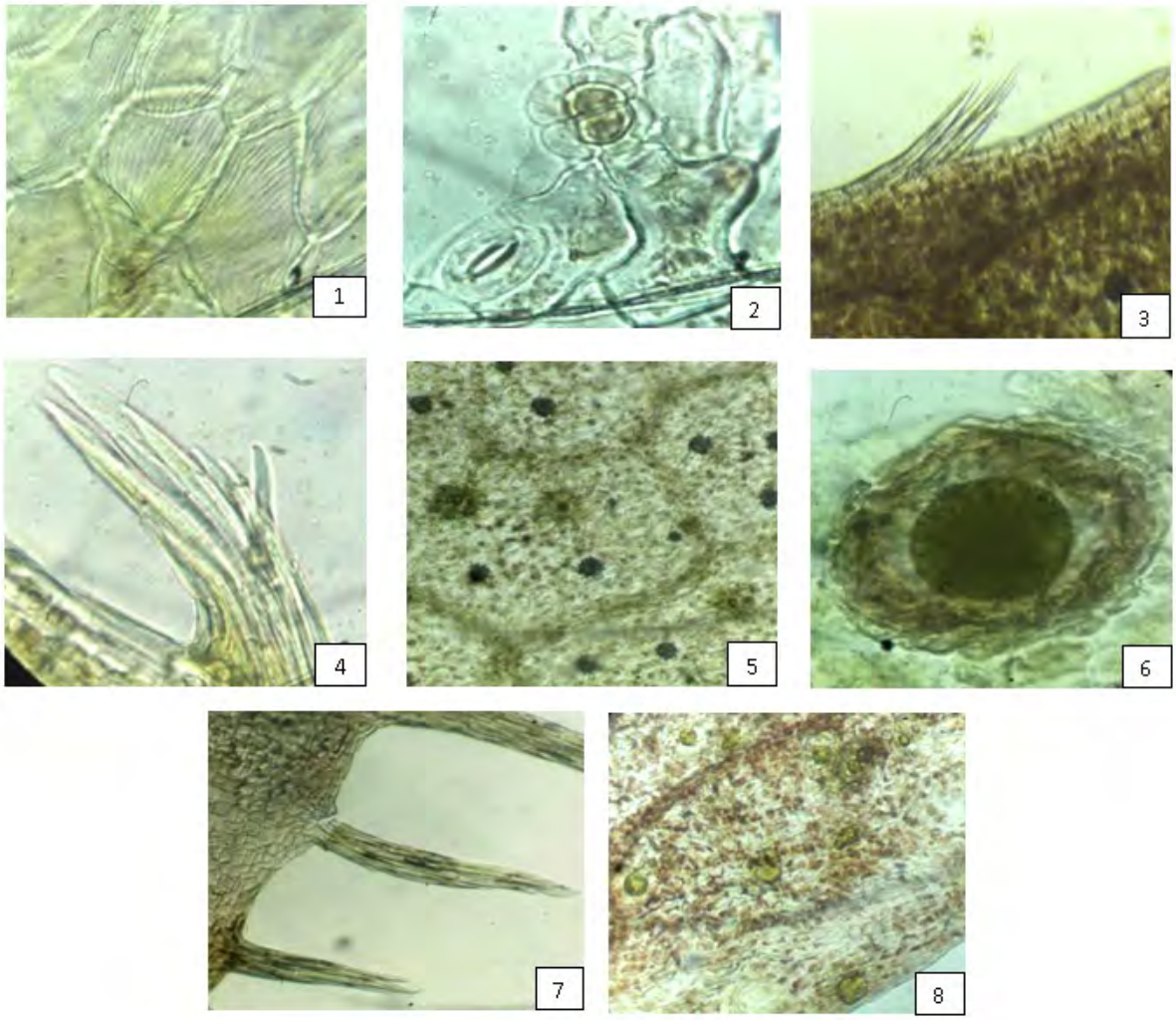


Рис. 1 – Горца перечного трава

1 – эпидермис верхней стороны листа со складчатой кутикулой (600×); 2 – эпидермис нижней стороны листа с устьицем и железкой с 2-клеточным основанием и 4-клеточной головкой (400×); 3 – пучковые волоски по краю листа (200×); 4 – пучковые волоски по краю листа (400×); 5 – друзы и вместилища с желтовато-зеленым содержимым в мезофилле листа (200×); 6 – вместилище в мезофилле листа (400×); 7 – пучковые волоски по краю раструба (200×); 8 – вместилища с зеленоватым содержимым (200×).

Измельченное сырье, порошок. При исследовании микропрепаратов должны быть видны фрагменты листовой пластинки с эпидермисом, состоящим из клеток со слабоизвилистыми и сильноизвилистыми стенками и устьицами аномоцитного типа. На некоторых фрагментах (край листовой пластинки, раструбы) должны быть видны пучковые волоски. На

поверхности фрагментов листа, стебля, раструба, околоцветника должны быть железки, в мезофилле - вместилища с зеленовато-бурым содержимым и друзы. Должны встречаться фрагменты кольчатых, спиральных и сетчатых сосудов.

Определение основных групп биологически активных веществ

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) кверцетина: около 0,05 г СО кверцетина, предварительно высушенного при температуре 130 - 135 °С в течение 3 ч, растворяют в 85 мл спирта 96 % в колбе при нагревании на водяной бане, охлаждают, доводят объем раствора тем же спиртом до 100 мл и перемешивают. Срок годности раствора 1 мес.

Тонкослойная хроматография

Около 1,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл спирта 90 %. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Охлажденное до комнатной температуры извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором наносят 10 мкл (0,01 мл) испытуемого раствора; рядом наносят 10 мкл (0,01 мл) раствора СО рутина (см. раздел «Количественное определение») и 10 мкл (0,01 мл) раствора СО кверцетина.

Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе в течение 2-3 мин, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 30 мин смесью растворителей бутанол - уксусная кислота - вода (4:1:2) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции сине-фиолетового цвета выше зон адсорбции растворов СО кверцетина и рутина.

Затем пластинку обрабатывают алюминия хлорида спиртовым раствором 1 %, выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100 – 105 °С в течение 2 – 3 мин и просматривают УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограммах растворов СО рутина и кверцетина должны обнаруживаться две зоны адсорбции с флюоресценцией желто-зеленого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться 2 зоны адсорбции с флуоресценцией желто-зеленого цвета на уровне стандартных образцов рутина и кверцетина; допускается обнаружение других зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 14 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 8 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 2,0 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм – не более 5 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм – не более 5 %.

Посторонние примеси

Сырье, изменившее окраску (побуревшее, пожелтевшее и почерневшее). *Цельное сырье* – не более 5 %;

Органическая примесь*. Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3 %;

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 0,5%.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье:* суммы флавоноидов в пересчёте на рутин – не менее 1,5 %;

Приготовление раствора СО рутина: около 0,05 г (точная навеска) СО рутина, предварительно высушенного до постоянной массы при температуре 130 – 135 °С, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 85 мл спирта 96 % при нагревании на водяной бане, охлаждают, доводят объем спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор А СО рутина). Срок годности раствора 30 сут.

2,0 мл раствора А СО рутина помещают в мерную колбу на 25 мл, прибавляют 0,5 мл уксусной кислоты раствора 30 %, 1 мл алюминия хлорида раствора 1 % и доводят до метки спиртом 96 % и перемешивают (раствор Б СО рутина).

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 150 мл, прибавляют 30 мл спирта 90 %. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин. После охлаждения до комнатной температуры содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл так, чтобы частицы сырья не попадали на фильтр. Экстракцию последовательно повторяют таким образом еще 2 раза. Извлечения фильтруют через тот же фильтр в ту

же мерную колбу. Объем фильтрата доводят спиртом 90 % до метки и перемешивают (раствор А испытуемого раствора).

2,0 мл раствора А испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляют 0,5 мл уксусной кислоты раствора 30 %, 1 мл алюминия хлорида раствора 1 % и доводят объём раствора спиртом 96 % до метки, перемешивают (раствор Б испытуемого раствора).

Оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора измеряют через 30 мин на спектрофотометре при длине волны 408 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют состоящий из 2,0 мл раствор А испытуемого раствора, 0,5 мл уксусной кислоты разбавленной 30 % и доводят спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО рутина. Для приготовления раствора сравнения в мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 2,0 мл раствора А СО рутина, добавляют 0,5 мл уксусной кислоты раствора 30 % и доводят до метки спиртом 96 %, перемешивают.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 2 \cdot P \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 2 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100 \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;

A_o – оптическая плотность раствора Б СО рутина;

a – навеска сырья, г;

a_o – навеска СО рутина, г;

P – содержание основного вещества в СО рутина, %;

W – влажность сырья, %.

Допускается вычислять содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в абсолютно сухом сырье с использованием удельного показателя поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 2 \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;

$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при длине волны 408 нм, равный 248;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Горца почечуйного трава **ФС.2.5.0068.18**

Polygoni persicariae herba **Взамен ГФ XI ст. 58**

Собранная в фазу цветения и высушенная трава дикорастущего однолетнего травянистого растения горца почечуйного *Polygonum persicaria* L., сем. гречишных - *Polygonaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Цельные или частично измельченные цветоносные олиственные побеги длиной до 40 см без грубых нижних частей, с плодами разной степени зрелости. Стебли ветвистые или простые, продольно - бороздчатые, со вздутыми узлами. Листья очередные, коротко-черешковые, ланцетные, длинно - заостренные с клиновидным основанием, на верхней стороне с темным пятном или без него, цельнокрайние, длиной до 16 см, шириной до 2,5 см. Находящиеся при основании черешков листьев пленчатые раструбы покрыты прижатыми волосками и плотно охватывают стебли, по верхнему краю с ресничками длиной от 0,2 до 4,5 мм. Соцветия верхушечные, густые колосовидные кисти. Цветки мелкие, с простым глубоко 4-5-рассеченным околоцветником, длиной около 2 - 3,5 мм. Доли околоцветника и цветонос с единичными железками (под лупой). Плоды трехгранные, чечевицеобразные или плоские с одной или с обеих сторон, орешки длиной 2,2 - 2,9 мм, шириной 1,6 - 2 мм, блестящие, черные или темно - коричневые.

Цвет стеблей зеленый, иногда с коричневатым оттенком; листьев с верхней стороны зеленый, с нижней - серовато - зеленый; околоцветника - розовый, реже белый, при основании зеленоватый. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения горьковатый.

Измельченное сырье. Кусочки стеблей, листьев, соцветий различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.

При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны: кусочки цветоносов и стеблей, чаще в продольном сечении, желтоватые в изломе, снаружи от светло-зеленого до коричневого цвета; кусочки листьев от серовато-зеленого до коричневого цвета; части бутонов желтовато-коричневого цвета; лепестки, их кусочки желтого, беловато-желтого и желто-коричневого цвета; отдельные чашелистики и их части, изредка - недозрелые плоды зеленовато-коричневого цвета.

Цвет от серовато - или желтовато-зеленого до темно-зеленого, с зеленовато-желтыми, желтыми, зеленовато-коричневыми, редко - розовато-фиолетовыми и коричневыми вкраплениями. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения горьковатый.

Порошок. Кусочки стеблей, листьев, соцветий, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

При рассмотрении порошка под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны: кусочки цветоносов и стеблей, чаще в продольном сечении, беловатые в изломе, снаружи - от светло-зеленого до коричневого цвета; кусочки листьев от серовато-зеленого до коричневого цвета; части бутонов желтовато-коричневого цвета; лепестки, их кусочки желтого, беловато-желтого и желто-коричневого цвета; отдельные чашелистики и их части, изредка - недозрелые плоды зеленовато-коричневого цвета.

Цвет от серовато-зеленого до темно-зеленого и зеленовато-коричневого с многочисленными белыми, желтовато-белыми, желтыми и коричневыми вкраплениями. Запах отсутствует, вкус водного извлечения горьковатый.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье, измельченное сырье.* При рассмотрении листа с поверхности должны быть видны клетки верхнего эпидермиса с прямыми стенками, нижнего - с извилистыми. Устьица с 2 - 4 околоустьичными клетками, иногда они окружены двумя клетками, расположенными вдоль устьичной щели (аномоцитный тип). На обеих поверхностях

листа имеются железки на 2-4-клеточной ножке с головкой из 8 (12 - 16) клеток, реже с 2-4 - клеточной головкой с бурым содержимым или бесцветные. По всей пластинке листа и по краю встречаются пучковые волоски, образованные 2 - 5 сросшимися клетками, которые на верхушке волоска часто слегка расходятся. В мезофилле листа крупные друзы оксалата кальция. На эпидермисе стебля и раструба, кроме вышеперечисленных признаков, имеются длинные, многоклеточные реснитчатые волоски по краю раструба, пучковые волоски по всей поверхности раструба, имеющие многоклеточное основание, часто остающееся при обламывании волосков, и пленчатые волоски, состоящие из нескольких рядов клеток и имеющие 2-клеточное основание. В ткани околоцветника - призматические кристаллы оксалата кальция.

Порошок. При исследовании микропрепаратов должны быть видны: фрагменты листовой пластинки верхнего эпидермиса с прямыми стенками, нижнего - с извилистыми стенками и устьицами, с 2-4 околоустьичными клетками, иногда окруженных 2 клетками, расположенными вдоль устьичной щели (аномоцитный тип).

На поверхности фрагментов листа должны быть железки на 2-4- клеточной ножке с головкой из 8 (12-16) клеток, реже с 2-4 - клеточной головкой с бурым содержимым или бесцветные. По поверхности фрагмента пластинки листа и по краю должны встречаться пучковые волоски, образованные 2-5 сросшимися клетками, которые на верхушке волоска часто слегка расходятся. В мезофилле фрагментов листа должны быть крупные друзы оксалата кальция. На фрагментах эпидермиса стебля и раструба, которые, кроме вышеперечисленных признаков, должны быть реснитчатые волоски и пленчатые волоски, состоящие из нескольких рядов клеток и имеющие 2-клеточное основание. На фрагментах ткани околоцветника должны быть призматические кристаллы оксалата кальция.

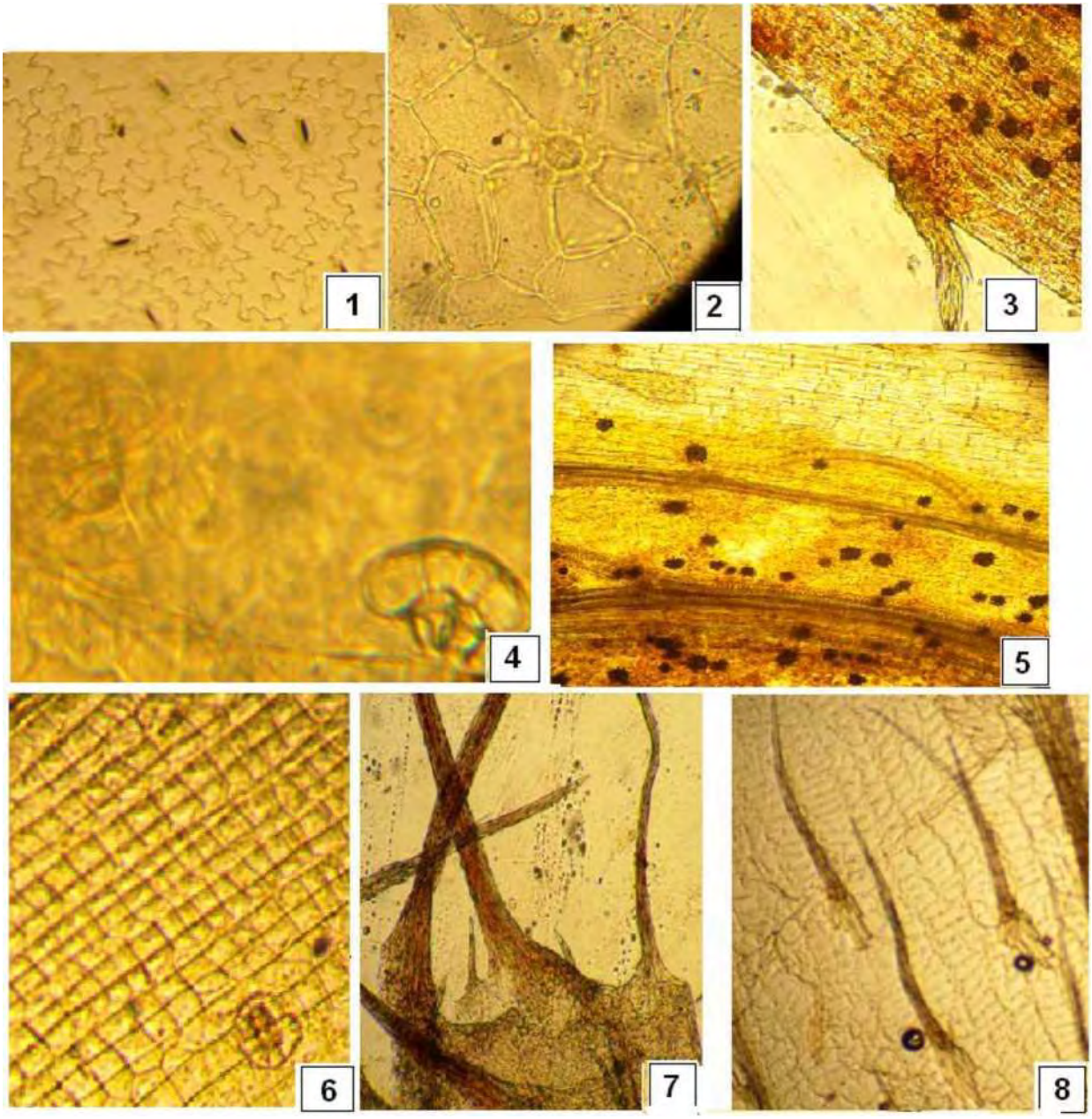


Рисунок – Горца почечуйного трава.

1 – фрагмент эпидермиса листа (нижняя сторона): извилистые клетки и устьица аномоцитного типа (100×), 2 – фрагмент эпидермиса листа (верхняя сторона) крупные клетки эпидермиса, железка с головкой из 8 клеток (400×), 3 – фрагмент листовой пластинки: пучковый волосок и друзы оксалата кальция (100×), 4 – фрагмент листовой пластинки с железкой, имеющей 2 клеточную ножку с головкой из 8 клеток (400×), 5 – фрагмент листовой пластинки: пучковые волоски на поверхности и друзы оксалата кальция (100×), 6 – фрагмент эпидермиса стебля с четковидными утолщениями стенок клеток и железкой (100×), 7 – фрагмент раструба: реснитчатые волоски на верхушке раструба (100×), 8 – фрагмент раструба: пучковые и пленчатые волоски (100×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Приготовление растворов.

Раствор СО рутина. Около 0,005 г СО рутина (рутина тригидрата) растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 месяцев при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Тонкослойная хроматография

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором наносят 5 мкл (0,005 мл) испытуемого раствора А (см. раздел «Количественное определение»), рядом - 5 мкл (0,005 мл) раствора СО рутина. Пластинку с нанесенными пробами сушат, помещают в камеру со смесью растворителей (без предварительного насыщения) этилацетат - муравьиная кислота безводная - вода (10:2:3) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм.

На хроматограмме раствора СО рутина должна обнаруживаться зона адсорбции сине-фиолетового цвета.

На хроматограмме раствора А должна обнаруживаться сине-фиолетовая зона адсорбции на уровне зоны адсорбции СО рутина, одна зона адсорбции сине-фиолетового цвета ниже зоны адсорбции СО рутина, две зоны адсорбции сине-фиолетового цвета выше зоны адсорбции СО рутина (флавоноиды).

Затем пластинку обрабатывают алюминия хлорида спиртовым раствором 1 %, выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100 – 105 °С в течение 2 – 3 мин и просматривают УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО рутина должна обнаруживаться зона адсорбции с флюоресценцией желто-зеленого цвета.

На хроматограмме раствора А должны обнаруживаться зоны адсорбции с желто-зеленой флюоресценцией: одна – на уровне зоны адсорбции СО рутина, одна – ниже зоны адсорбции СО рутина и две зоны выше зоны адсорбции СО рутина (флавоноиды).

Качественная реакция

2,5 г измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 250 мл, заливают 50 мл кипящей воды и кипятят на плитке в течение 5 мин, полученное извлечение фильтруют через складчатый фильтр. К 1 – 3 мл фильтрата прибавляют 1 мл железа(III) аммония сульфата раствора 1 %; должно наблюдаться черно-синее окрашивание (дубильные вещества).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье*, *порошок* – не более 13 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье*, *порошок* – не более 10 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье*, *измельченное сырье*, *порошок* **–** не более 1 %**.**

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм - не более 5 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %. *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Сырье, изменившее окраску (потемневшее, почерневшее.) *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3 %.

Органическая примесь*. Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3 %.

Минеральная примесь*. Цельное сырье, измельченное сырье*, *порошок* – не более 1 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок.* Суммы флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 0,9 %; экстрактивных веществ, извлекаемых 50 % спиртом, – не менее 19 %.

Приготовление растворов.

Раствор СО рутина. Около 0,05 г (точная навеска) СО рутина, предварительно высушенного при температуре 130 – 135 °С в течение 3 ч, растворяют в 85 мл спирта 96 % в мерной колбе вместимостью 100 мл при нагревании на водяной бане, охлаждают, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор А СО рутина). Раствор используют свежеприготовленным.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл спирта 70 %. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 60 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Горячее извлечение фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 50 мл так, чтобы частицы сырья не попадали на фильтр. После охлаждения до комнатной температуры объем извлечения доводят спиртом 70 % до метки и перемешивают (раствор А испытуемого раствора).

1,0 мл раствора А испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 0,5 мл уксусной кислоты разведенной 30%, 1 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 %, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора).

Через 40 мин измеряют оптическую плотность раствора Б испытуемого

раствора на спектрофотометре при длине волны 408 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл раствора А, 0,5 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, доведенный спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО рутина, состоящего из 1,0 мл раствора А СО рутина, 0,5 мл уксусной кислоты разведенной 30%, 1 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 %, доведенного спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл раствора А испытуемого раствора СО рутина, 0,5 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, доведенный спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в абсолютно сухом сырье в процентах (Х) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 50 \cdot 1 \cdot 25 \cdot 100 \cdot P \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 100 \cdot 1 \cdot 25 \cdot (100-W) \cdot 100} = \frac{A \cdot a_0 \cdot 50 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot (100-W)},$$

где: A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
A_0 – оптическая плотность раствора Б СО рутина;
a – навеска сырья, г;
a_0 – навеска СО рутина, г;
P – содержание основного вещества в СО рутина, %;
W – влажность сырья, %.

Допускается содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в абсолютно сухом сырье вычислять с использованием удельного показателя поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100-W)} = \frac{A \cdot 125000}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100-W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при длине волны 408 нм, равный 248;
a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Экстрактивные вещества. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1, навеска 1,0 г сырья, измельченного до величины частиц 1 мм, экстрагент –спирт 50 %).

Примечание. Определение суммы флавоноидов в пересчете на рутин проводят в сырье, предназначенном для производства лекарственных растительных препаратов (пачки, фильтр-пакеты); определение экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 50 %, проводят для сырья, предназначенного для производства экстрактов.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Горца птичьего (спорыша) трава	**ФС.2.5.0069.18**
Polygoni avicularis herba	**Взамен ГФ XI ст. 56**

Собранная в фазу цветения и высушенная трава дикорастущего однолетнего травянистого растения горца птичьего (спорыша) – *Polygonum aviculare* L., сем. гречишных – *Polygonaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Цельные или частично измельченные олиственные цветоносные побеги длиной до 40 см. Стебли тонкие, ветвистые, цилиндрические, коленчатые. Корни тонкие стержневые, ломкие, желтоватые. Листья простые, очередные, короткочерешковые, цельнокрайние, различные по форме, широколопатчатые или широкоэллиптические, обратнояйцевидные, реже узкопродолговатые или почти линейные, тупые или островатые, длиной до 3 см, шириной до 1 см. У основания листьев находятся два прилистника, сросшиеся в раструб. Раструбы серебристо-белые, пленчатые, рассеченные. Цветки расположены в пазухах листьев по 1 – 5. Цветки на коротких цветоножках; околоцветник простой, длиной 3 – 5 мм, глубоко надрезанный почти до 2/3, пятичленный. Тычинок 6 (8), пестик с верхней одногнездной завязью и 2 – 3 столбиками.

Цвет листьев и стеблей зеленый или серовато-зеленый, околоцветника в нижней части – бледно-зеленый, в верхней – белый или розовый. Запах слабый. Вкус водного извлечения слегка вяжущий.

Измельченное сырье. Кусочки стеблей, листьев и цветков, иногда корней, различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет серовато-зеленый. Запах слабый. Вкус водного извлечения слегка вяжущий.

Порошок. Кусочки стеблей, листьев, корней и цветков различной формы, проходящие серовато-зелёного цвета, проходящий через сито с отверстиями размером 2 мм. Цвет серовато-зеленый. Запах слабый. Вкус водного извлечения слегка вяжущий.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении листа с поверхности должны быть видны клетки эпидермиса верхней и нижней сторон с прямыми утолщенными стенками и нередко с бурым содержимым, стенки клеток верхнего эпидермиса часто четковидно утолщенные. Кутикула по краю листа и над крупными жилками продольно складчатая. Устьица окружены чаще 3 клетками эпидермиса, из которых одна значительно меньше других (анизоцитный тип). По краю пластинки 1 - 3 ряда клеток эпидермиса имеют толстые оболочки и слегка вытянуты в сосочки. В мезофилле листа много друз оксалата кальция. Характерно наличие механических волокон, расположенных чаще над жилками с верхней и с нижней стороны, а также вдоль края пластинки листа. Волокна имеют извилистый контур и толстые оболочки.

При рассмотрении раструба с поверхности должны быть видны прямостенные клетки эпидермиса без устьиц, короткие в основании раструба и прозенхимные в остальной части по краю в несколько рядов расположены очень узкие клетки. Мезофилл выражен слабо, друзы отсутствуют.

При рассмотрении цветка с поверхности должны быть видны прозенхимные извилистостенные клетки эпидермиса.

При рассмотрении поперечного среза стебля должно быть видно пучковое строение с полостью в сердцевине, тонкие стебли без полости. В рёбрах отчётлива выраженная уголковая колленхима. Первичная кора узкая, с отчётливыми, расположенными кольцом полостями. Пучки открытые коллатеральные, над флоэмой в 1 - 3 слоя расположены механические волокна. Эндодерма однослойная, в виде крахмалоносного влагалища.

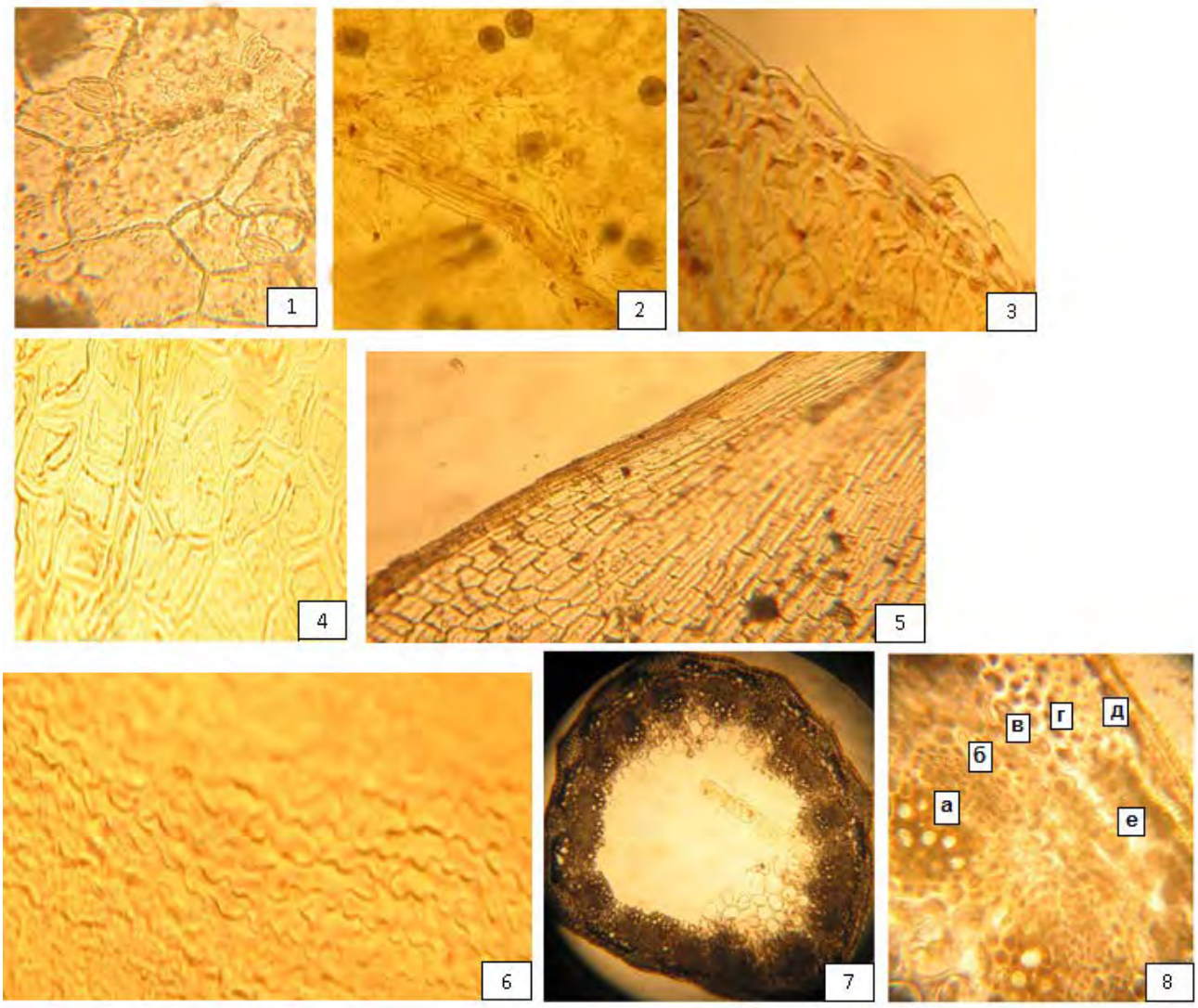


Рисунок - Горца птичьего лист и стебель.

1 – фрагмент листа с устьицем анизоцитного типа и четковидно утолщенными стенками клеток (×200); 2 – фрагмент листа с друзами и механическим волокном (×200); 3 – фрагмент края листа с толстостенными, слегка вытянутыми в сосочек клетками эпидермиса с бурым содержимым (×200); 4 – фрагмент листа с толстостенными клетками эпидермиса (×200); 5 – фрагмент раструба с короткими и прозенхимными клетками эпидермиса и несколькими рядами очень узких клеток по краю (×200); 6 – фрагмент околоцветника с прозенхимными извилистостенными клетками эпидермиса (×200); 7 – поперечный срез стебля: пучковое строение с полостью в сердцевине (×90); 8 – фрагмент поперечного среза стебля: а – открытый коллатеральный пучок; б – склеренхима; в – эндодерма; г – уголковая коленхима; д – эпидерма; е – полость в первичной коре (×200).

Измельченное сырье. При рассмотрении препарата должны быть видны фрагменты листа с друзами и извилистыми механическими волокнами в мезофилле, с прямыми толстостенными клетками эпидермиса, нередко с бурым содержимым и слегка вытянутыми в сосочек, с устьицами анизоцитного типа; фрагменты раструба почти без мезофилла, с клетками от коротких до прозенхимных, по краю с несколькими рядами очень узких клеток; фрагменты околоцветника с прозенхимными извилистостенными клетками эпидермиса; фрагменты стебля пучкового строения с колленхимой в углах и полостями в первичной коре; фрагменты механических волокон листа.

Порошок. При рассмотрении порошка должны быть видны фрагменты мезофилла с друзами, клетки эпидермиса с прямыми четковидно утолщенными стенками с бурым содержимым, иногда слегка вытянутыми в сосочки, фрагменты механических волокон, раструбов с клетками от коротких до прозенхимных, по краю с несколькими рядами очень узких клеток; фрагменты околоцветника с прозенхимными извилистостенными клетками; фрагменты стеблей пучкового строения с колленхимой в углах и полостями в первичной коре.

Определение основных групп биологически активных веществ

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) кверцетина: около 0,005 г кверцетина растворяют в 10 мл спирта 95 % и перемешивают. Срок годности раствора 1 мес при хранении в хорошо укупоренной упаковке, в прохладном, защищенном от света месте.

Тонкослойная хроматография

Около 1,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл спирта 70 %. Колбу присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на кипящей водяной бане в течение

30 мин, охлаждают до комнатной температуры и фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 10 мкл испытуемого раствора; рядом наносят 10 мкл раствора СО кверцетина.

Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе в течение 2 - 3 мин, затем помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 60 мин смесью растворителей бутанол - кислота уксусная ледяная - вода (4:1:2), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм.

На хроматограмме раствора СО кверцетина должна наблюдаться зона адсорбции сине-фиолетового цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться 3 зоны адсорбции сине-фиолетового цвета, верхняя из которых находится на уровне зоны адсорбции СО кверцетина.

Затем пластинку обрабатывают алюминия хлорида спиртовым раствором 2 %, выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100 °С в течение 2 - 3 мин и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО кверцетина должна наблюдаться зона адсорбции с желто-зеленой флюоресценцией.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться 3 зоны адсорбции с флуоресценцией желто-зеленого цвета, верхняя из которых находится на уровне зоны адсорбции СО кверцетина.

Качественная реакция

К 5 мл фильтрата (см. «Количественное определение») прибавляют 4 - 5 капель железа(III) аммония сульфата раствора 1 %; должно наблюдаться черно-зеленое окрашивание (дубильные вещества).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 13 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 13 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 4 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, - не более 5 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, - не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, - не более 5 %. *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, не более 5 %, частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси.

Корни. *Цельное сырье* – не более 2 %.

Потемневшие и почерневшие части травы. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 2 %;

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 2 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок:* суммы флавоноидов в пересчёте на авикулярин - не менее 0,5 %.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 150 мл, прибавляют 30 мл спирта 70 %, колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры под струёй холодной воды и фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. Экстракцию повторяют еще 2 раза указанным выше способом. Извлечения фильтруют через тот же фильтр в ту же мерную колбу, фильтр промывают спиртом 70 %, доводят объем фильтрата тем же растворителем до метки и перемешивают (раствор А).

4,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляют 0,5 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, прибавляют 2 мл алюминия хлорида раствора 2 % в спирте 96 % и доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б).

Через 20 мин измеряют оптическую плотность раствора Б на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор состоящий из 4,0 мл раствора А, 0,5 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, доведенный спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на авикулярин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 100 \cdot 25}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 4 \cdot (100 - W)};$$

где A – оптическая плотность раствора Б;

$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса авикулярина с алюминия хлоридом при длине волны 410 нм, равный 330;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Девясила высокого корневища и корни **ФС.2.5.0070.18**

Inulae helenii rhizomata et radices **Взамен ГФ XI ст. 73**

Собранные осенью, очищенные от остатков надземных частей и земли, высушенные корневища и корни дикорастущего и культивируемого многолетнего травянистого растения девясила высокого – *Inula helenium* L., сем. астровых – *Asteraceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Корневища и корни цилиндрические, большей частью продольно - расщепленные, снаружи продольно - мелкоморщинистые, длиной 2 – 20 см, толщиной 0,5 – 3 см, твердые, в изломе слабозернистые, с заметными коричневатыми блестящими точечками – вместилища с эфирным маслом (при рассмотрении под лупой (10×)).

Цвет наружной поверхности серовато - коричневый, на изломе - желтовато - белый или желтовато - серый. Запах своеобразный, ароматный. Вкус водного извлечения пряный, горьковатый.

Измельченное сырье. Кусочки корней и корневищ различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет кусочков с наружной поверхности серовато - коричневый, излома – желтовато - белый, желтовато - серый. Запах своеобразный, ароматный. Вкус водного извлечения пряный, горьковатый.

Порошок. Кусочки корневищ и корней различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Цвет серовато - коричневый, желтовато - белый, желтовато - серый. Запах своеобразный, ароматный. Вкус водного извлечения пряный, горьковатый.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении микропрепаратов поперечного среза корня должна быть видна многорядная серовато - коричневая пробка, кора и древесина. Корень имеет вторичное строение. Кора представлена крупными паренхимными тонкостенными клетками, уменьшающимися по направлению к камбию. Среди паренхимных клеток обнаруживаются участки флоэмы в виде мелких клеток, образующих небольшие группы. Клетки паренхимы коры содержат инулин в виде бесформенных, бесцветных, сильно преломляющих свет «глыбок» (препарат просматривают без нагревания!). Во вторичной коре заметны участки луба в виде мелких клеток, расположенных небольшими группами. Линия камбия четкая. В древесине видны крупные сосуды, особенно близ камбия, расположенные группами. Над сосудами могут наблюдаться волокна либриформа. Сердцевинные лучи пронизывают древесину, и состоят из 1-5 рядов тангентально вытянутых клеток. В коре и древесине корня имеются крупные схизогенные вместилища со смолой и эфирным маслом. Они округлые или овальные, с хорошо заметным слоем выделительных клеток. После окраски раствором судана III капли смолистого содержимого во вместилищах приобретают яркий оранжево - красный цвет.

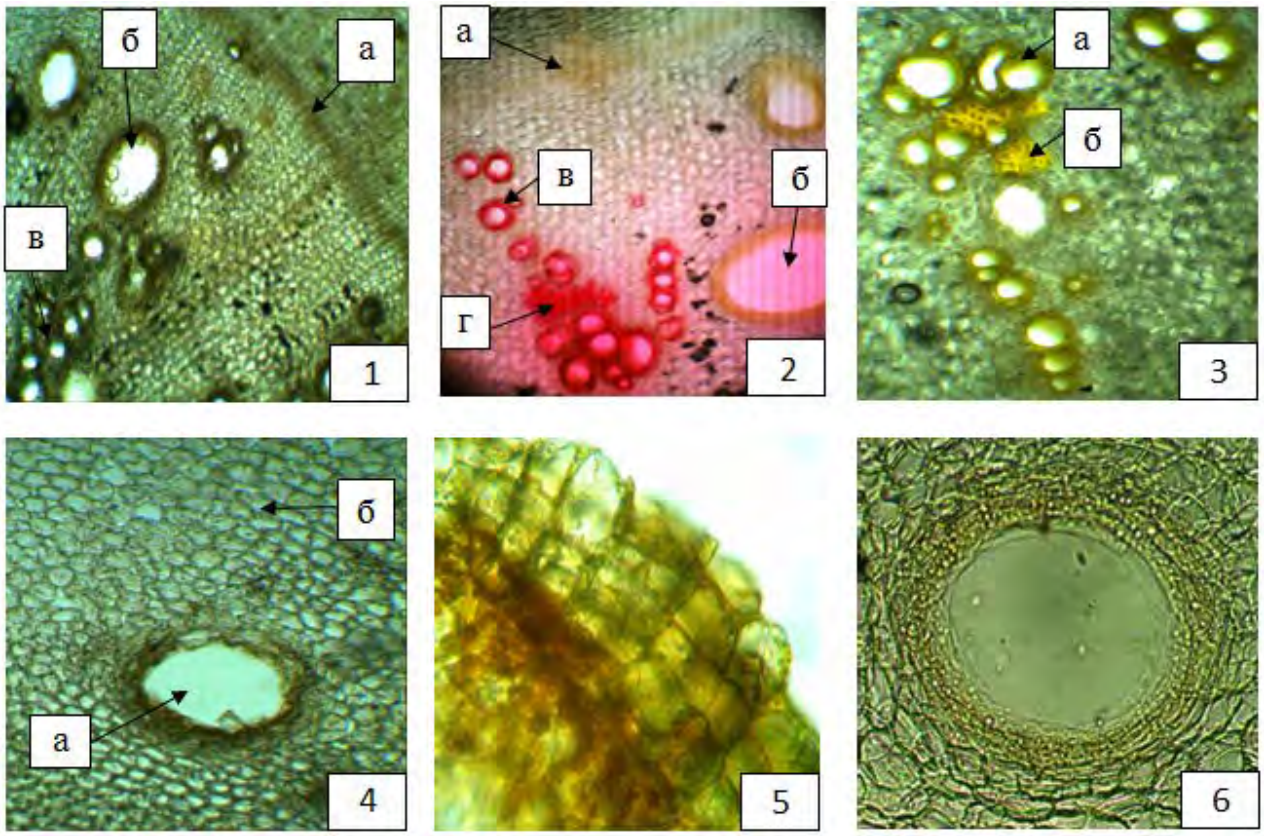


Рисунок 1 – Девясила высокого корневища и корни.
1 – поперечный срез корня: а – линия камбия, б – эфирномасличные вместилища, в – сосуды (100×); 2 – поперечный срез корня: а – линия камбия, б – эфирномасличные вместилища, в – сосуды, г – группы волокон либриформа (100×); 3 – поперечный срез корня: а – сосуды, б – группы волокон либриформа (100×); 4 – поперечный срез корня: а – эфирномасличное вместилище; б – паренхимные клетки (100×); 5 – пробка (400×); 6 – эфирномасличные вместилища (400×).

Измельченное сырье. При рассмотрении «давленых препаратов» должны быть видны фрагменты пробки серовато - коричневого цвета, фрагменты паренхимы коры со схизогенными вместилищами со смолой и эфирным маслом. Фрагменты паренхимы с глыбками инулина; группы волокон с утолщенными стенками или их фрагменты; фрагменты сосудов (сетчатых и лестничных) и трахеиды.

Порошок. При рассмотрении микропрепарата порошка должны быть видны фрагменты пробки серовато - коричневого цвета, фрагменты паренхимы с глыбками инулина, обрывки паренхимы с эфирномасличными вместилищами

или разорванные вместилища, фрагменты волокон, фрагменты сосудов (сетчатых и лестничных).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Около 1,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 50 мл, прибавляют 10 мл хлороформа, перемешивают в течение 10 мин и фильтруют через бумажный фильтр «красная лента» (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 10 мкл испытуемого раствора. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 1 ч смесью растворителей бензол – этилацетат - спирт 96 % (94:3:0,5) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, опрыскивают ванилина раствором в серной кислоте.

На хроматограмме испытуемого раствора (в средней части) должны обнаруживаться основные зоны адсорбции красного или красно-фиолетового цвета (терпеноиды); допускается обнаружение других зон адсорбции.

Качественные реакции

При нанесении на поперечный срез девясила высокого корневищ и корней, на соскоб частиц измельченного сырья или порошок 0,1 мл тимола раствора спиртового 20 % и 0,05 мл серной кислоты концентрированной должно наблюдаться оранжево – красное окрашивание (инулин).

При нанесении на поперечный срез девясила высокого корневищ и корней, на соскоб частиц измельченного сырья или порошок 0,1 мл раствора йода спиртового 1 % не должно наблюдаться синего окрашивания (крахмал).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 13 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 10 %.

Зола, нерастворимая в кислоте хлористоводородной. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 4 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 10 %. *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Дряблых корневищ и корней, оснований стеблей и других частей девясила. *Цельное сырье* – не более 5 %.

Корневищ и корней, потемневших в изломе. *Цельное сырье* – не более 5 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 0,5 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 1,0 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок:* суммы фруктозанов и фруктозы в пересчете на инулин – не менее 25 %; экстрактивных веществ, извлекаемых водой – не менее 35 %.

Сумма фруктозанов и фруктозы.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 60 мл воды и нагревают на кипящей водяной бане (с погружением колбы) в течение 45 мин, затем охлаждают при комнатной температуре в течение 5 мин.

Полученное извлечение фильтруют через вату в мерную колбу вместимостью 200 мл так, чтобы частицы сырья не попали на фильтр. Колбу промывают 10 мл воды и фильтруют в ту же мерную колбу. Экстракцию водой повторяют еще дважды (первый раз нагревают 45 мин с 30 мл воды, второй раз – 15 мин с 30 мл воды), фильтруя извлечение в ту же мерную колбу. Затем сырье переносят на вату, колбу ополаскивают 10 мл воды, фильтруя смыв через вату еще 10 мл воды. Вату со шротом отжимают. К полученному извлечению в мерную колбу прибавляют 1 мл свинца (II) ацетата раствора 10 %, перемешивают и оставляют на 10 мин.

Затем в колбу добавляют 2 мл динатрия гидрофосфата безводного раствора 5%, перемешивают и оставляют на 5 мин. Затем объем раствора в колбе доводят водой до метки и перемешивают. Содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10 - 15 мл фильтрата.

2 мл фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают (раствор А испытуемого рас-

твора).

В каждую из двух конических колб вместимостью по 50 мл помещают по 5 мл резорцина спиртового раствора 0,1 % и по 10 мл хлористоводородной кислоты 30 %. Затем в первую колбу добавляют 5 мл раствора А испытуемого раствора, во вторую 5 мл воды (раствор сравнения А). Обе колбы нагревают на водяной бане при температуре 80 °С в течение 20 мин, затем охлаждают до комнатной температуры. Содержимое колб количественно переносят в соответствующие мерные колбы вместимостью 25 мл и доводят объем растворов в них хлористоводородной кислотой 30 %до метки, перемешивают (раствор Б испытуемого раствора, раствор сравнения Б).

Через 15 мин измеряют оптическую плотность раствора Б на спектрофотометре при длине волны 483 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения Б.

Содержание суммы фруктозанов и фруктозы в пересчете на инулин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 200 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 2 \cdot 5 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 5000000}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения продуктов реакции инулина с резорцином в кислой среде при длине волны 483 нм, равный 498;
a – навеска сырья, г;
W – влажность сырья, %.

Экстрактивные вещества. В соответствии с ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1, экстрагент – вода).

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарствен-

ного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Донника трава **ФС.2.5.0011.15**

Meliloti herba

Собранная в фазу цветения, высушенная трава дикорастущих и культивируемых двулетних травянистых растений донника лекарственного – *Melilotus officinalis* (L.) Desr. и донника рослого – *Melilotus altissimus*Thuil., сем.бобовых – *Fabaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки.*Цельное сырье.*Цельные или частично измельченные облиственные цветущие верхушки и боковые веточки с ребристым стеблем диаметром до 3 мм и длиной до 30 см. Прилистники ланцетные или шиловидные, почти всегда цельнокрайние, редко у самых нижних листочков с 1–2 зубчиками. Нижние листья обратнояйцевидные, верхние – продолговатые или ланцетные, по краю с обеих сторон с 10–13 неровными зубчиками у донника лекарственного и с 8–20 зубчиками у донника рослого.

Цветки мотыльковые мелкие длиной от 5 до 7 мм. Чашечка колокольчатая пятизубчатая, остающаяся при плоде, голая у донника лекарственного и опушенная у донника рослого. Иногда встречаются в незначительном количестве мелкие незрелые плоды – бобы длиной от 3 до 5 мм, неясносетчатые или поперечно-морщинистые, голые или покрытые редкими волосками. Семя одно, реже два.

Цвет стеблей зеленый, желтовато-зеленый, зеленовато-желтый, на изломе – серовато- или желто-белый, листьев и плодов – зеленый, желтовато-зеленый, зеленовато-желтый, цветков и бутонов – желтый. Запах

характерный.Вкус водного извлечения горьковатый или солоновато-горьковатый.

Измельченное сырье. При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) виднымкусочки листьев, стеблей и соцветий различной формы, отдельные цветки, бутоны, плоды и их части, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 5 мм. Цвет стеблей снаружи зеленый, желтовато-зеленый, зеленовато-желтый, на изломе – серовато- или желтовато-белый, листьев и плодов – зеленый, желтовато-зеленый, зеленовато-желтый с коричневыми вкраплениями бобов, цветков и бутонов – желтый. Запах характерный.Вкус водного извлечения горьковатый или солоновато-горьковатый.

*Порошок.*При рассмотрении порошка под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки листьев и стеблей различной формы, отдельные бутоны, части цветков и плодов, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Цвет серовато-зеленый, зеленовато-желтый с серовато- или желтовато-белыми, желтыми, темно-зелеными, коричневыми вкраплениями. Запах характерный.Вкус водного извлечения горьковатый или солоновато-горьковатый.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье, измельченное сырье.* При рассмотрении листа с поверхности виднызодиаметрические клетки верхнего эпидермиса со слабоизвилистыми стенками, нижнего – с более извилистыми стенками. Складчатая кутикула –на верхушках зубчиков. Устьица овальные, окружены 2–5 околоустьичными клетками (аномоцитный тип), расположены на верхнем и нижнем эпидермисе. Встречаются волоски 2 типов: простые одноклеточные, тонкостенные и толстостенные с заостренным концом и бородавчатой кутикулой; головчатые волоски с овальной многоклеточной головкой на короткой 1–2-клеточной ножке, вокруг места прикрепления волоска клетки эпидермиса образуют розетку. Жилки листа окружены кристаллоносной обкладкой.

При рассмотрении лепестков с поверхности видны клетки эпидермиса с сосочковидными выростами. Клетки эпидермиса чашелистиков и цветоножек продольно вытянутые и имеют прямые или слабоизвилистые стенки, иногда со складчатой кутикулой. Устьица аномоцитного типа, расположенные с наружной стороны чашелистиков. На поверхности чашелистиков и цветоножек имеются многочисленные простые одноклеточные волоски и головчатые волоски и их фрагменты. Жилки чашелистиков окружены кристаллоносной обкладкой.

При рассмотрении «давленого» препарата стебля видны продольно вытянутые клетки эпидермиса с прямыми стенками, устьица аномоцитного типа, редкие, на поверхности встречаются волоски, характерные для данного сырья, но часто крупнее. Паренхима состоит из клеток овальной или вытянутой формы, встречаются механические волокна, кристаллы оксалата кальция, сосуды спирального типа.

Порошок. При рассмотрении микропрепаратов видны фрагменты эпидермиса с клетками со слабоизвилистыми и извилистыми стенками, устьицами овальными, окруженными 2–5 околоустьичными клетками (аномоцитный тип). У фрагментов эпидермиса лепестков наблюдаются сосочковидные выросты. На некоторых фрагментах листа и чашелистиков встречаются характерные волоски: простые одноклеточные, тонкостенные и толстостенные с заостренным концом и бородавчатой кутикулой, вокруг места прикрепления волоска клетки эпидермиса образуют розетку; головчатые волоски с овальной многоклеточной головкой на короткой 1–2-клеточной ножке и их фрагменты. Фрагменты мезофиллавключают жилки с кристаллоносной обкладкой. Проводящие пучки представлены спиральными сосудами.

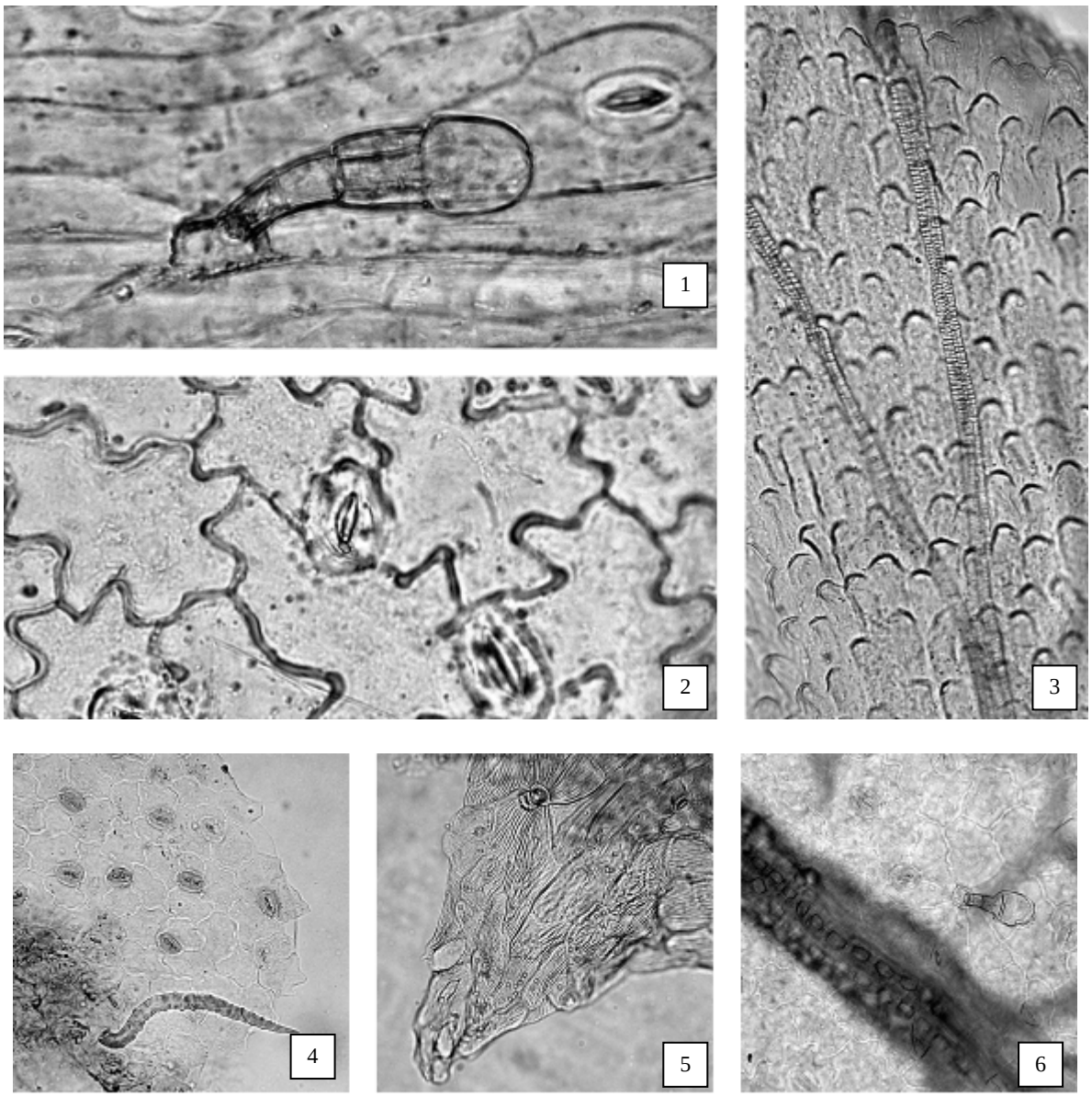


Рисунок –Донника трава.
1 – фрагмент эпидермиса стебля с головчатым волоском (400×);2– клетки нижнего эпидермиса листа с извилистыми стенками, устьица аномоцитного типа (400×);3– фрагмент лепестка (наружная сторона): клетки эпидермиса с сосочковидными выростами (400×);4–простой одноклеточный бородавчатый волосок (200×);5– фрагмент листа: клетки эпидермиса со складчатой кутикулой на зубчатом крае листа (200×);6–головчатый волосок, радиально расположенные клетки эпидермиса в месте прикрепления волоска, кристаллоносная обкладка вдоль жилки (200×).

Определение основных биологически активных веществ

1. ***Тонкослойная хроматография***

Около1,8 г измельченного сырья до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм,помещают в колбу со шлифом

вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл спирта 96 % и нагревают с обратным холодильником на водяной бане в течение 30 мин.После охлаждения полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта высокоэффективной хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 20 мкл испытуемого раствора и 20 мкл раствора стандартного образца(СО) кумарина (см. раздел «Количественное определение» раствор А СО кумарина). Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре, помещают в камерупредварительно насыщенную в течение не менее 30 мин смесьюрастворителей уксусная кислота разведенная 12 % – эфир – толуол (10:50:50), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, обрабатываюткалия гидроксида 2 М раствором спиртовым и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО кумарина должна обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией зеленого, голубовато-зеленого или желтовато-зеленного цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться зоны адсорбции с флуоресценцией: зеленого, голубовато-зеленого или желтовато-зеленого цвета на уровне зоны адсорбции СО кумарина;зона адсорбции сине-голубого цвета ниже зоны адсорбции СО кумарина, также возможно обнаружение зоны адсорбции ниже этой зоны с флуоресценцией зеленого, голубовато-зеленого или желтовато-зеленого цвета; допускается обнаружение других зон адсорбции (кумарины).

2. ***Высокоэффективная жидкостная хроматография***

Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора, полученного для количественного определения, должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме раствора СО кумарина (см. раздел «Количественное определение»).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок*– не более 14 %.

Зола общая. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок*– не более 10 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок*– не более 2 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %. *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Стебли диаметромсвыше 3 мм. *Цельное сырье*–не более 2 %.

Сырье, изменившее окраску (потемневшее и почерневшее).*Цельное сырье,измельченное сырье*– не более 2 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье,измельченное сырье* –не более 1 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье,измельченное сырье, порошок* – не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок:*кумарина –не менее 0,3 %.

Приготовление растворов.

Раствор СО кумарина. Около 0,025 г (точная навеска) СО кумарина растворяют в спирте 96 % в мерной колбе вместимостью 50 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор А СО кумарина). Срок годности растворане более 30 сут при хранении в хорошо укупоренной упаковке,в прохладном защищенном от света месте.

1,0 мл раствора АСО кумарина переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б СО кумарина). Раствор Б используют свежеприготовленным.

Ацетонитрила раствор 25 % вфосфорной кислоты растворе 0,3 %. 250 мл ацетонитрила для хроматографии помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, доводят до метки фосфорной кислоты раствором 0,3 % и перемешивают. Полученный раствор фильтруют и дегазируют.Срок годности раствора 7 сут при хранении в хорошо укупоренной упаковке, в прохладном защищенном от света месте.

*Фосфорной кислоты раствор 0,3 %.*3,0 мл фосфорной кислоты концентрированной помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, доводят объем раствора водой для хроматографии до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют и дегазируют.Срок годности раствора 30 сут при хранении в хорошо укупоренной упаковке, в прохладном защищенном от света месте.

Проверка пригодности хроматографической системы.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- фактор асимметрии пика (Т) кумарина не менее 0,8 и не более 1,5;
- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику кумарина, – не менее 1500 теоретических тарелок;
- относительное стандартное отклонение площади пика кумарина – не более 3 %.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм. Около 1,8 г (точная

навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл спирта 96 %, нагревают с обратным холодильником на водяной бане в течение 30 мин.После охлаждения надосадочную жидкость фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. Извлечение повторяют дважды, используя 30 и 25 мл спирта 96 % соответственно, при этом при последнем извлечении бумажный фильтр переносят в колбу для экстракции. Объем извлечения в мерной колбе доводят до метки спиртом 96 %, одновременно промывая колбу, в которой проводили экстракцию, и перемешивают.Полученное извлечение фильтруют через фильтр с размером пор 0,45 мкм, отбрасывая первые 1 – 2 мл фильтрата (раствор Аиспытуемого раствора).

Условия хроматографирования

Колонка	125 × 4,0 мм, эндкепированныйоктадецилсилил(C_{18}) силикагельдля хроматографии, 5 мкм.
Предколонка	4 × 4 мм, эндкепированныйоктадецилсилил(C_{18}) силикагель для хроматографии, 5 мкм.
Подвижная фаза	Ацетонитриларастворе 25 % вфосфорной кислоты растворе 0,3 %. Фосфорной кислоты раствор 0,3 %.
Скорость потока, мл/мин	1,0
Температура колонки, ^{o}C	комнатная (20 ± 2)
Детектор	диодная матрица или спектрофотометрический; длина волны 275 нм
Объем вводимой пробы,	10

мкл

Время 12

хроматографирования,

мин

Хроматографируют попеременно раствор Аиспытуемого раствораи раствор Б СО кумарина, получая не менее 3 хроматограмм. Результаты считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы». Расчет содержания кумарина, проводят методом внешнего стандарта.

Содержание кумарина в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100 \cdot P}{S_0 \cdot 50 \cdot 10 \cdot a \cdot (100-W) \cdot 100} = \frac{S \cdot a_0 \cdot 20 \cdot P}{S_0 \cdot a \cdot (100-W)},$$

где *S*–площадь пика кумарина на хроматограмме раствора Аиспытуемого раствора;
a_0 – навеска СО кумарина, г;
S_0 –площадьпика кумарина на хроматограммераствора Б СО кумарина;
a– навеска сырья, г;
P – содержание основного вещества в СО кумарина, %;
W – влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Дуба кора	**ФС.2.5.0071.18**
Quercus cortex	**Взамен ГФ XI ст. 3**

Собранная ранней весной кора поросли, молодых ветвей и тонких стволов дикорастущих и культивируемых деревьев дуба обыкновенного (черешчатого) - *Quercus robur* L. (*syn.; Q. pedunculata Ehrh*.) и дуба скального - *Quercus petraea (Mattuschka) Liebl. (syn.: Q. sessiliflora Salisb.)*, сем. буковых - *Fagaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Куски коры трубчатые, желобоватые или в виде узких полосок различной длины, толщиной около 2-3 мм (до 6 мм). Наружная поверхность блестящая, реже матовая, гладкая или слегка морщинистая, иногда с мелкими трещинками; часто заметны поперечно – вытянутые чечевички. Внутренняя поверхность с многочисленными продольными тонкими выдающимися ребрышками. В изломе наружная кора зернистая, ровная, внутренняя - сильно волокнистая, занозистая.

Цвет коры снаружи светло-коричневый или светло-серый, серебристый, внутри желтовато-коричневый.

Запах слабый, своеобразный, усиливающийся при смачивании коры водой. Вкус водного извлечения сильно вяжущий.

Измельчённое сырье. Кусочки коры различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет светло-коричневый, светло-серый, серебристый или желтовато-коричневый. Запах слабый, своеобразный, усиливающийся при смачивании коры водой. Вкус водного извлечения сильно вяжущий.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* На поперечном срезе должен быть виден коричневый пробковый слой из многочисленных рядов клеток. В наружной коре находятся друзы оксалата кальция, группы каменистых клеток и на некотором расстоянии от пробки тангентально расположенный механический пояс, состоящий из чередующихся групп лубяных волокон и каменистых клеток. В наружной коре по направлению от пояса внутрь разбросаны группы волокон и каменистых клеток. Некоторые клетки паренхимы содержат флобафены в виде включений красно - коричневого цвета. Во внутренней коре многочисленные, тангентально вытянутые группы лубяных волокон с кристаллоносной обкладкой, расположены параллельными концентрическими поясами. Между группами волокон проходят однорядные сердцевинные лучи, реже встречаются более широкие лучи, которые близ камбия содержат группы каменистых клеток, что обусловливает при высыхании образование продольных ребер, видимых на внутренней поверхности.

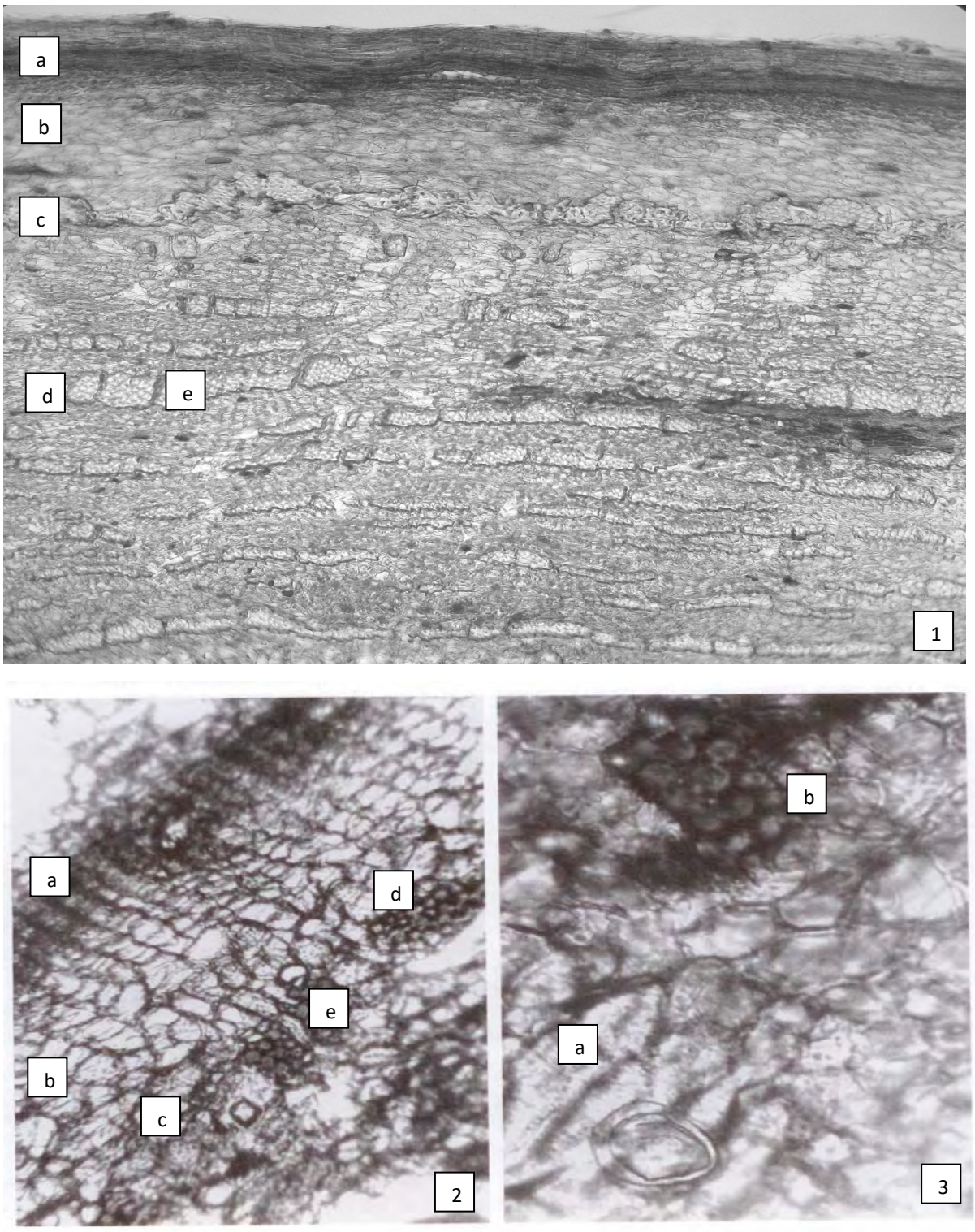


Рисунок – Дуба кора.

1 – поперечный срез коры (100×): a – пробка, b – колленхима, c – механический пояс, d – лубяные волокна, e – сердцевинный луч; 2 – поперечный срез коры (125×): a – пробка, b – колленхима, c – группа каменистых клеток с кристаллами оксалата кальция, d – группа лубяных волокон, e – сердцевинный луч; 3 – колленхима (a), группа лубяных волокон (b) (300×).

Измельчённое сырье. При рассмотрении микропрепаратов должны быть видны многочисленные фрагменты групп волокон с кристаллоносной обкладкой и группами каменистых клеток, фрагменты коричневой пробки; изредка - друзы оксалата кальция; содержимое паренхимных клеток должно окрашиваться железа(III) аммония сульфата раствором 1 % в черно - синий цвет.

Определение основных групп биологически активных веществ

Качественные реакции

1. При смачивании внутренней поверхности коры каплей железа(III) аммония сульфата раствора 1 % наблюдается черно - синее окрашивание (дубильные вещества).

2. Измельченную кору в количестве 0,1 г кипятят в течение 2 - 3 мин с 10 мл воды, охлаждают и фильтруют. К 1 мл фильтрата прибавляют 2 - 3 капли железа(III) аммония сульфата раствора 1 % должно наблюдаться черно - синее окрашивание (дубильные вещества).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 15 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 8 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1,5 %.

Измельченность сырья. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, - не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, - не более 5 %.

Посторонние примеси

Кусков коры толщиной более 6 мм. *Цельное сырье* - не более 5 %.

Кусков коры, потемневшей с внутренней поверхности. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 5 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье* - дубильные вещества в пересчете на танин - не менее **7** %.

Определение дубильных веществ в пересчете на танин проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1).

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Дурмана обыкновенного листья	**ФС.2.5.0072.18**
Daturae stramonii folia	**Взамен ФС XI вып. 2 ст. 24**

Собранные в период от начала цветения до конца плодоношения и высушенные листья дикорастущего и культивируемого растения дурмана обыкновенного – *Datura stramonium L.,* сем пасленовых – *Solanaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Цельные или частично измельченные листья яйцевидной формы, голые, на верхушке заостренные, при основании большей частью клиновидные, по краю неравномерно крупновыемчато – зубчатые, глубоковыемчато – лопастные, черешки цилиндрические. Жилкование перистое. По жилкам с нижней стороны заметно слабое опушение. Жилки, средние и первого порядка, сильно выступающие с нижней стороны, выпуклые, голые, желтовато – белые. Длина листьев около 20 - 25 см, ширина до 20 см.

Цвет листьев с верхней стороны темно – зеленый, с нижней - несколько светлее.

Запах слабый, специфический, усиливающийся при увлажнении листьев. Вкус водного извлечения не определяется (сырье ядовито).

Измельченное сырье. Смесь кусочков листьев различной формы, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет зеленый.

Запах слабый, специфический, усиливающийся при увлажнении листьев. Вкус водного извлечения не определяется (сырье ядовито).

Микроскопические признаки. *Цельное сырье и измельченное сырье.* При рассмотрении микропрепарата листа с поверхности должны быть видны

клетки эпидермиса: на верхней стороне со слегка извилистыми стенками, на нижней – с более извилистыми. Устьица многочисленные, окружены 3 - 4 околоустьичными клетками, из которых одна значительно меньше других (анизоцитный тип), преобладают на нижней стороне листовой пластинки. Волоски двух типов: простые и головчатые. Простые – крупные, из двух, реже 5 клеток с тонкими стенками и грубобородавчатой поверхностью, расположенные, главным образом, по жилкам и по краю листа. Головчатые волоски более мелкие с многоклеточной (реже одноклеточной) округлой или обратно – яйцевидной головкой на короткой, слегка изогнутой одноклеточной ножке. У молодых листьев головчатых волосков значительно больше, чем у старых. В клетках паренхимы видны в большом количестве тупоконечные друзы оксалата кальция.

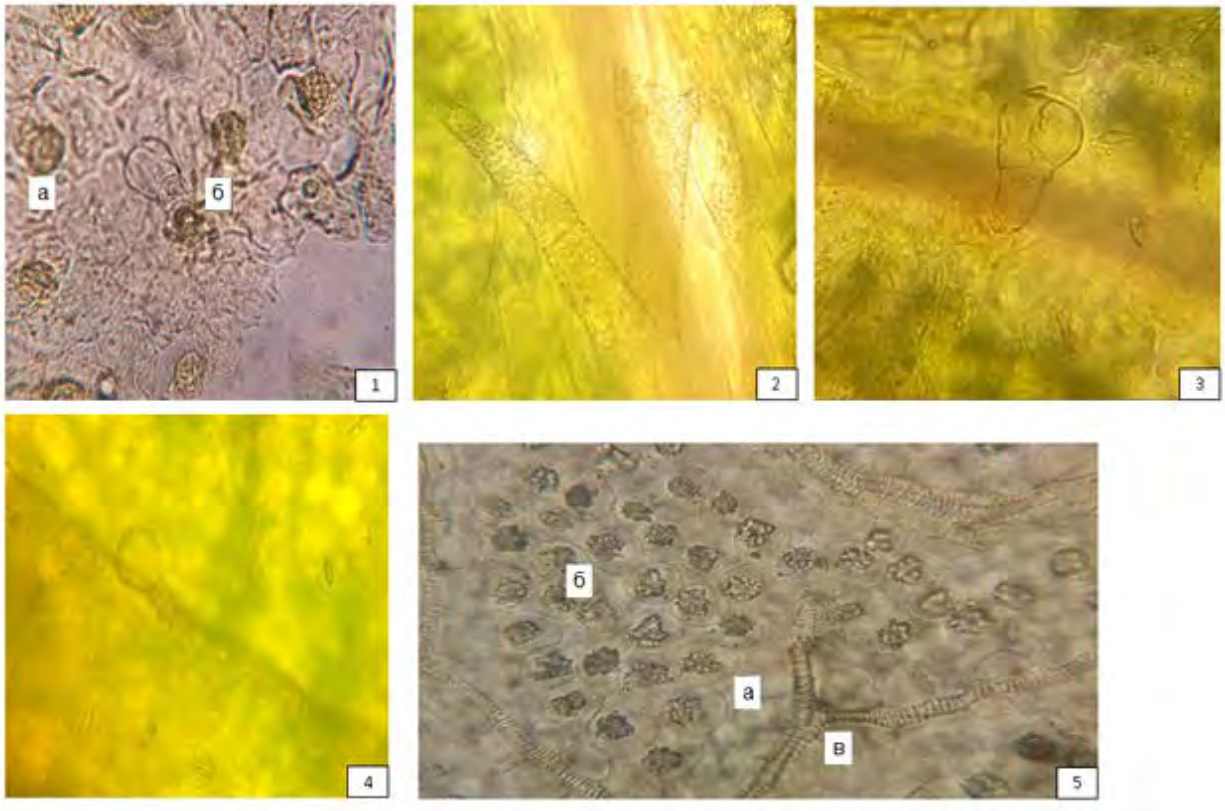


Рисунок – Дурмана листья.

1 – фрагмент эпидермиса листа: устьице анизоцитного типа (а), головчатый волосок (б) (400×), 2 – простой волосок с грубобородавчатой поверхностью (400×), 3 – головчатый волосок с двуклеточной головкой (400×), 4 – головчатый волосок с одноклеточной головкой (400×), 5 – губчатая паренхима (а), клетки с друзами (б) и сосуд кольчатого типа (в) (1000×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) атропина сульфата. 0,05 г СО атропина сульфата растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают.

Срок годности раствора 1 мес.

Тонкослойная хроматография

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 20 мкл (0,02 мл) испытуемого раствора (см. «Количественное определение», раствор Б) и рядом 10 мкл (0,01 мл) раствора СО атропина сульфата. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин системой растворителей ацетон – аммиака раствор 10 % (95:5), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, обрабатывают реактивом Драгендорфа, просматривают при дневном свете и фиксируют результаты разделения в течение не более 10 мин.

На хроматограмме раствора СО атропина сульфата должна обнаруживаться зона адсорбции оранжевого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться доминирующая зона адсорбции оранжевого цвета на уровне зоны адсорбции СО атропина сульфата; допускается обнаружение других зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 14 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 20 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье*: частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, – не более 5 %; *измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Листьев, изменивших окраску (пожелтевших, почерневших). *Цельное сырье* - не более 5 %;

Частицы сырья, изменившие окраску (пожелтевшие, почерневшие). *Измельченное сырье - не более 5 %;*

Других частей растения (стеблей, цветков, отдельных плодов). *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 2 %.

Органическая примесь*. Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 0,5 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное и измельченное сырье*: сумма алкалоидов в пересчете на гиосциамин – не менее 0,20 % и не более 0,25 %.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 10,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 150 мл эфира, 7 мл аммиака раствора и взбалтывают в течение 1 ч. Эфирное извлечение быстро фильтруют через вату в колбу вместимостью 200 мл, прикрывая воронку часовым стеклом. К фильтрату прибавляют 5 мл воды, энергично взбалтывают и оставляют в покое до просветления эфирного слоя, после чего 90 мл эфирного извлечения переносят в делительную воронку вместимостью 200 мл. Цилиндр дважды ополаскивают эфиром порциями по 10 мл, которые присоединяют к эфирному извлечению в делительной воронке (раствор А).

Из эфирного извлечения алкалоиды экстрагируют последовательно 20, 15, 10 мл хлористоводородной кислоты раствора 1 % до полного их извлечения (проба с реактивом Майера), каждый раз фильтруя полученное извлечение через смоченный водой бумажный фильтр диаметром 5 см во вторую делительную воронку вместимостью 200 мл. Фильтр промывают дважды хлористоводородной кислоты раствором 1 % по 5 мл, присоединяя промывную жидкость к общему кислотному извлечению.

Кислотное извлечение подщелачивают раствором аммиака до щелочной реакции по фенолфталеину и алкалоиды извлекают последовательно 20, 15, 10 мл хлороформа, взбалтывая по 3 мин каждый раз, и хлороформное извлечение фильтруют в колбу для отгонки вместимостью 100 мл через бумажный фильтр, содержащий 4 – 5 г натрия сульфата безводного свежепрокаленного, смоченного хлороформом. Фильтр промывают хлороформом дважды по 5 мл (раствор Б). Хлороформ отгоняют на роторном испарителе до объема около 1 – 2 мл, остаток хлороформа в колбе удаляют продуванием воздуха до полного исчезновения запаха растворителя. Сухой остаток растворяют в 15 мл 0,02 М раствора хлористоводородной кислоты при нагревании на водяной бане при температуре 60 °С, прибавляют 2 капли метилового красного раствора спиртового и 1 каплю метиленового синего, и избыток хлористово-

дородной кислоты титруют 0,02 М раствором натрия гидроксида до появления зеленой окраски.

Содержание суммы алкалоидов в пересчете на гиосциамин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(15 - V) \cdot 0{,}005780 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot (100 - W)},$$

где V – объем 0,02 М раствора натрия гидроксида, пошедшего на титрование, мл;
0,005780 – количество алкалоидов в пересчете на гиосциамин, соответствующее 1 мл 0,02 М раствора хлористоводородной кислоты;
a – навеска сырья, соответствующая объему эфирного извлечения, взятого на анализ, г;
W – влажность сырья, %.

Примечание. В случае завышенного содержание суммы алкалоидов (в пересчете на гиосциамин в %) расчет количества лекарственного растительного сырья, необходимого для производства лекарственного препарата, следует проводить по формуле, приведенной в ОФС «Лекарственное растительное сырье. Фармацевтические субстанции растительного происхождения».

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Душицы обыкновеннойтрава **ФС.2.5.0012.15**

Origani vulgaris herba

Собранная во время цветения, высушенная трава многолетнего культивируемого и дикорастущего травянистого растения душицы обыкновенной – *Origanum vulgare* L., сем. яснотковых – *Lamiaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Цельные или частично измельченные цветоносные, олиственные стебли длиной до 20см.Листья супротивные, черешковые, продолговато-яйцевидные, к верхушке заостренные, мелкозубчатые или почти цельнокрайние длиной 2–4 см, с белесыми волосками, расположенными, в основном, по жилкам, и коричневатыми блестящими точками (погруженные железки), главным образом, с нижней стороны. Стебли четырехгранные, опушенные или почти голые, вверху разветвленные.Соцветия щитковидно-метельчатые на концах ветвей, раскидистые, многоцветковые, состоят из компактных или удлиненно-колосовидных полумутовок, на цветоносах видны блестящие мелкие округлые железки. Прицветники длиннее чашечки, продолговатые или яйцевидные, острые, без железок. Чашечка с треугольно-ланцетовидными зубцами, снаружи с редкими волосками, блестящими округлыми железками и торчащими из зева белесыми волосками, которые растут с внутренней стороны чашечки по линии вдоль оснований зубцов. Цветки длиной 3–5 мм, венчик двугубый, слегка опушенный. Семена мелкие, длиной около 1 мм, округлые с заостренным кончиком.

Цвет листьев сверху –зеленый, иногда с фиолетовым оттенком, снизу –

светло-зеленый; стеблей – зеленый, коричневато-зеленый, редко – светло-коричневый, как правило, с фиолетовым оттенком; цвет прицветников – зеленовато-фиолетовый, чашечки – зеленовато-фиолетовый или фиолетовый; венчика – коричневато-розовый, реже коричневый; семян – коричневый или светло-коричневый.Запах характерный.Вкус водного извлечения горьковато-пряный, слегка вяжущий.

Измельченное сырье. Кусочки стеблей, часто продольно-расщепленных, листьев, а также отдельные цветки и семена, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.

При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки стеблей зеленых, коричневато-зеленых или светло-коричневых, часто с фиолетовым оттенком, нередко продольно-расщепленных с беловатой губчатой сердцевиной; кусочки зеленых листьев с блестящими коричневатыми точками (погруженные железки) и белесыми волосками; цельные зеленовато-фиолетовые или фиолетовые чашечки или их кусочки с железками и редкими волосками снаружи и длинными белесыми волосками на уровне зубцов с внутренней стороны; кусочки коричневого или коричневато-розового венчика с белесыми волосками; мелкие округлые коричневые или светло-коричневые семена.

Цвет измельченного сырья зеленый, серовато-зеленый с белыми, коричневыми, фиолетовыми, коричневато-фиолетовыми, беловато-зелеными и розовыми вкраплениями. Запах характерный. Вкус водного извлечения горьковато-пряный, слегка вяжущий.

Микроскопические признаки. *Цельное, измельченное сырье.* При рассмотрении микропрепаратов с поверхности должны быть видны клетки эпидермиса верхней стороны листа со слабоизвилистыми стенками, нижней стороны листа – с более извилистыми стенками; стенки клеток нередко четковидно-утолщенные. Устьица на обеих сторонах листа окружены

2клетками эпидермиса, смежные стенки которых расположены перпендикулярно устьичной щели (диацитный тип). Волоски 2 типов (простые и головчатые) расположены по всей пластинке листа, в большем количестве –на нижней его стороне. Простые волоски, главным образом, многоклеточные, с бородавчатой поверхностью и утолщенными стенками (у крупных волосков часто одна или более клеток спавшиеся); головчатые волоски на одноклеточной ножке с овальной одноклеточной головкой. Округлые эфирномасличные железки, у которых можно иногда видеть 8 радиально расположенных выделительных клеток, преобладают на нижней стороне листа и находятся в углублении ниже уровня эпидермиса (погруженные), у места прикрепления железки эпидермальные клетки образуют розетку, как правило, из 10–16 клеток. Клетки эпидермиса стебля почти многоугольные, вытянутые, волоски и устьица характерного строения, железки мелкие, редко встречаются ветвистые многоклеточные волоски. Эпидермис наружной поверхности чашечки с редкими устьицами, многочисленными простыми 2–3-клеточными волосками и крупными железками; с внутренней стороны чашечки клетки эпидермиса сильноизвилистые с хорошо заметной складчатостью кутикулы, по всей поверхности – мелкие головчатые волоски, по линии вдоль оснований зубцов расположены длинные многоклеточные волоски с бородавчатой кутикулой; в нижней части чашечки видны сосудистые пучки, окруженные пористыми толстостенными одревесневшими склеренхимными волокнами. Клетки эпидермиса венчика с наружной стороны извилистые, на лопастях видны многоклеточные волоски и редкие непогруженные железки; с внутренней стороны лопасти покрыты сосочковидными выростами, среди которых иногда встречаются пальцевидные волоски со штриховатой кутикулой, в средней трети венчика эти волоски многочисленные. В покровной ткани пыльников видны клетки с лучистым утолщением стенок; пыльцевые зерна – сферические, со слегка бородавчатой экзиной и 6 порами.

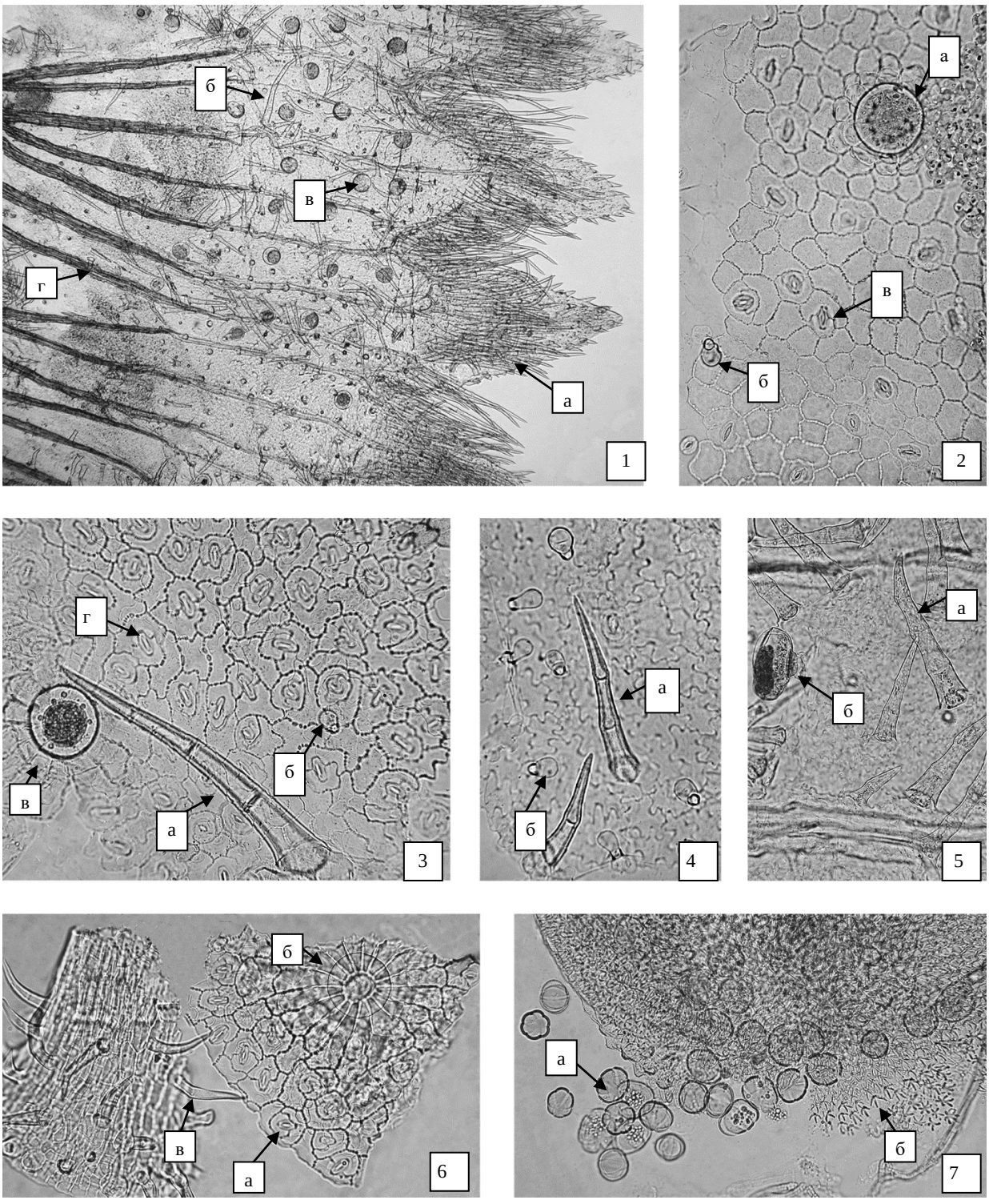


Рисунок –Душицы трава.

1 – фрагмент чашечки с наружной стороны: а – многоклеточные волоски, просвечивающиеся с внутренней стороны зева, б – многоклеточный волосок с наружной стороны, в – железка, г – склеренхимные одревесневшие волокна (40×); 2 – фрагмент эпидермиса верхней стороны листа: а – железка, б – головчатый волосок, в – устьица диацитного типа (200×);3 – фрагмент эпидермиса нижней стороны листа: а – многоклеточный волосок, б – головчатый волосок, в – железка,г – устьица диацитного типа (200×);

4 – фрагмент эпидермиса прицветного листа: а – многоклеточный волосок, б – головчатый волосок (200×); 5 – фрагмент чашечки с наружной стороны: а – многоклеточный волосок, б – непогруженная железка (200×); 6 – фрагмент эпидермиса листа: а – устьица диацитного типа, б – железка с розеткой клеток вокруг,в – простой волосок фрагмента эпидермиса прицветного листа (200×); 7 – фрагмент пыльника: а – сферическая пыльца с шестью порами, б – клетки с лучистым утолщением стенок (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

*Раствор стандартного образца (СО) рутина.*Около 0,001 г СО рутина (рутина тригидрата) растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора 3 мес при хранении в хорошо укупоренной упаковке в прохладном защищенном от света месте.

Около 1,0 г измельченного сырья до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм,помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл спирта 96 %, нагревают с обратным холодильником на водяной бане в течение 10 мин. После охлаждения до комнатной температуры полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят по 20 мкл испытуемого раствора и раствора СО рутина. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин смесью растворителей толуол – этилацетат–муравьиная кислота безводная–вода(10:20:5:2), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 –90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей. Пластинку выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100–105°С в течение 2–3 мин, еще теплую обрабатывают последовательно дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира раствором 1% в спирте 96 % и макрогола 400 раствором спиртовым 5 %и через 30 мин

просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО рутина должна обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией желто-оранжевого или оранжевого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией желто-оранжевого цвета выше зоны адсорбции СОрутина, над ней зона адсорбции синего или фиолетово-синего цвета, еще выше зона адсорбции ярко-голубого или голубого цвета со слабым светло-зеленым оттенком, над ней зона голубовато-синего цвета; допускается обнаружение других зон адсорбции (флавоноиды).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность.*Цельное сырье,измельченное сырье*– не более 13 %.

Зола общая.*Цельное сырье,измельченное сырье*– не более 10 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте.*Цельное сырье, измельченное сырье*– не более 5 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, –не более 5 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, –не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, –не более 5 %.

Посторонние примеси

Сырье, изменившее окраску (потемневшее и почерневшее).*Цельное сырье, измельченное сырье*– не более 7 %.

Кусочки стеблей и боковых веточек, в том числе отделенные при анализе*. Цельное сырье,измельченное сырье*– не более 40 %.

Органическая примесь.*Цельное сырье,измельченное сырье*– не более 1 %.

Минеральная примесь.*Цельное сырье,измельченное сырье* – не более 1 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье,измельченное сырье:* сумма флавоноидов в пересчете на лютеолин –не менее 0,8 %; *цельное сырье*: эфирного масла –не менее 0,1 %, *измельченное сырье:* эфирного масла – не менее 0,08 %.

Сумма флавоноидов

Приготовление растворов.

Раствор СО лютеолина. Около 0,01 г (точная навеска) СО лютеолина, предварительно высушенного при температуре 130–135 ºС в течение 3 ч, растворяют в 25 мл спирта 96 % в мерной колбе вместимостью 50 мл при нагревании на водяной бане, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор А СО лютеолина). Срок годности раствора не более 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

1,0 мл раствора А СО лютеолинапомещаютв мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 3 мл алюминия хлорида раствора 2 % в спирте 96 % и 0,1 мл уксусной кислоты концентрированной, доводят раствор до метки спиртом 96 % и перемешивают (раствор Б СО лютеолина).

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм. Около 0,80 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл спирта 60 %, взвешивают с погрешностью ± 0,01 г, присоединяют к обратному холодильнику и

нагревают на водяной бане в течение 1,5 ч. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры и взвешивают, при необходимости доводят содержимое колбы спиртом 60 % до первоначальноймассы. Содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр, отбрасывая первые 25 мл фильтрата (раствор А испытуемого раствора).

1,0 мл раствора А испытуемого растворапомещаютв мерную колбу вместимостью 25 мл,прибавляют 3 мл алюминия хлорида раствора 2 % в спирте 96 % и 0,1 мл уксусной кислоты концентрированной, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора).

Оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора измеряют через 40 мин на спектрофотометре при длине волны 400 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из1мл раствора Аиспытуемого раствораи 0,1 мл уксусной кислоты концентрированной, доведенный спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора БСО лютеолина в тех же условиях. В качестве раствора сравнения используютраствор, состоящий из1 мл раствора А СО лютеолина, 0,1 мл уксусной кислоты концентрированной,доведенный спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин и абсолютно сухое сырье в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 50 \cdot 25 \cdot P \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot 50 \cdot 25 \cdot a \cdot 1 \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot a_0 \cdot P \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
A_o – оптическая плотность раствора Б СО лютеолина;
a – навеска сырья, г;
a_o – навеска СО лютеолина, г;
P– содержание основного вещества в СО лютеолина, %;
W – влажность сырья, %.

Допускается содержания суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин вычислять с использованием удельного показателя поглощения комплекса лютеолина с алюминия хлоридом.

$$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1см}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 125000}{A_{1см}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;

$A_{1см}^{1\%}$ –удельный показатель поглощениякомплекса лютеолина с алюминия хлоридом при длине волны 400 нм, равный 549;

a– навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Эфирное масло.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 2, из 25,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, время перегонки 2 ч).

Примечания

1. Содержание эфирного масла определяют в сырье, предназначенном для получения эфирного масла.
2. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин определяют в сырье, предназначенном для получения водных, спиртовых, спирто-водных извлечений, экстрактов.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Ели обыкновенной шишки **ФС.2.5.0073.18**

Piceae abietis strobili **Взамен ГФ XI вып. 2 ст. 81**

Собранные летом до созревания семян и высушенные шишки дикорастущего и культивируемого растения ели обыкновенной – *Picea abies* (L.) *Karst.,* сем. сосновых *Pinaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье*. Шишки овально - цилиндрические или продолговато-эллиптические, длиной 3 – 14 см, шириной 1,5 – 5 см; чешуя двух типов: наружная – кроющая и внутренняя – семенная. Обе чешуи срастаются друг с другом. Шишки образованы спирально расположенными кроющими чешуями, в пазухах которых имеются более крупные семенные чешуи. Кроющие чешуи ланцетовидные, пленчатые, с вытянутой бахромчатой по краю верхушкой, красновато-коричневого цвета. Семенные чешуи у молодых шишек удлиненно-овальные, зеленовато-коричневые. У более зрелых шишек семенные чешуи значительно крупнее – длиной 2,5 – 2,7 см, шириной 1,4 – 1,5 см, широко ромбические, на верхушке усеченные, неравно-зубчатые, у основания клиновидно-суженные; их поверхность зеленовато- или светло-коричневая, в верхней части блестящая, у основания более темная, матовая. У основания каждой семенной чешуи лежат два семени, прикрытые пленчатым крылом. Семена яйцевидные, коричневые, длиной до 5 мм, шириной до 3 мм; свободный конец крыла длиной до 11 мм, шириной до 6 мм. Между семенными чешуями часто заметны смолистые выделения.

Запах характерный. Вкус водного извлечения вяжущий, горьковато-

пряный.

Измельченное сырье. Смесь кусочков сырья различной формы, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 10 мм. При рассмотрении должны быть видны кусочки семенной чешуи коричневого, светло-коричневого, зеленовато-коричневого цвета. Кроющие чешуи, измельченные или целые красновато-коричневого цвета. Семена яйцевидные, коричневые, длиной до 5 мм, шириной до 3 мм. Должны быть видны частички крыла семени разного размера и формы. Запах ароматный. Вкус водного извлечения вяжущий, горьковато-пряный.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении микропрепаратов поперечного среза семенной чешуи в средней части должны быть видны клетки эпидермиса с обеих сторон, овальные, толстостенные, покрытые толстым слоем кутикулы.

На поверхности чешуи, особенно на внутренней стороне, часто встречаются простые одноклеточные, реже двухклеточные волоски сосочковидной или конической формы. На внешней стороне волоски меньшего размера и расположены реже. Под эпидермисом с обеих сторон расположены 1 – 4 слоя механических клеток с сильно утолщенными и более или менее (в зависимости от стадии развития шишки) одревесневшими оболочками, пронизанными тонкими порами. На срезе верхней части семенной чешуи с внешней стороны должны быть видны клетки эпидермиса с толстым слоем кутикулы, под эпидермисом расположен слой колленхимы. С внутренней стороны находятся клетки эпидермиса с тонким слоем кутикулы, а под эпидермисом расположен слой склеренхимы. На срезе центральной и нижней части чешуи с обеих сторон под эпидермисом находится слой склеренхимы.

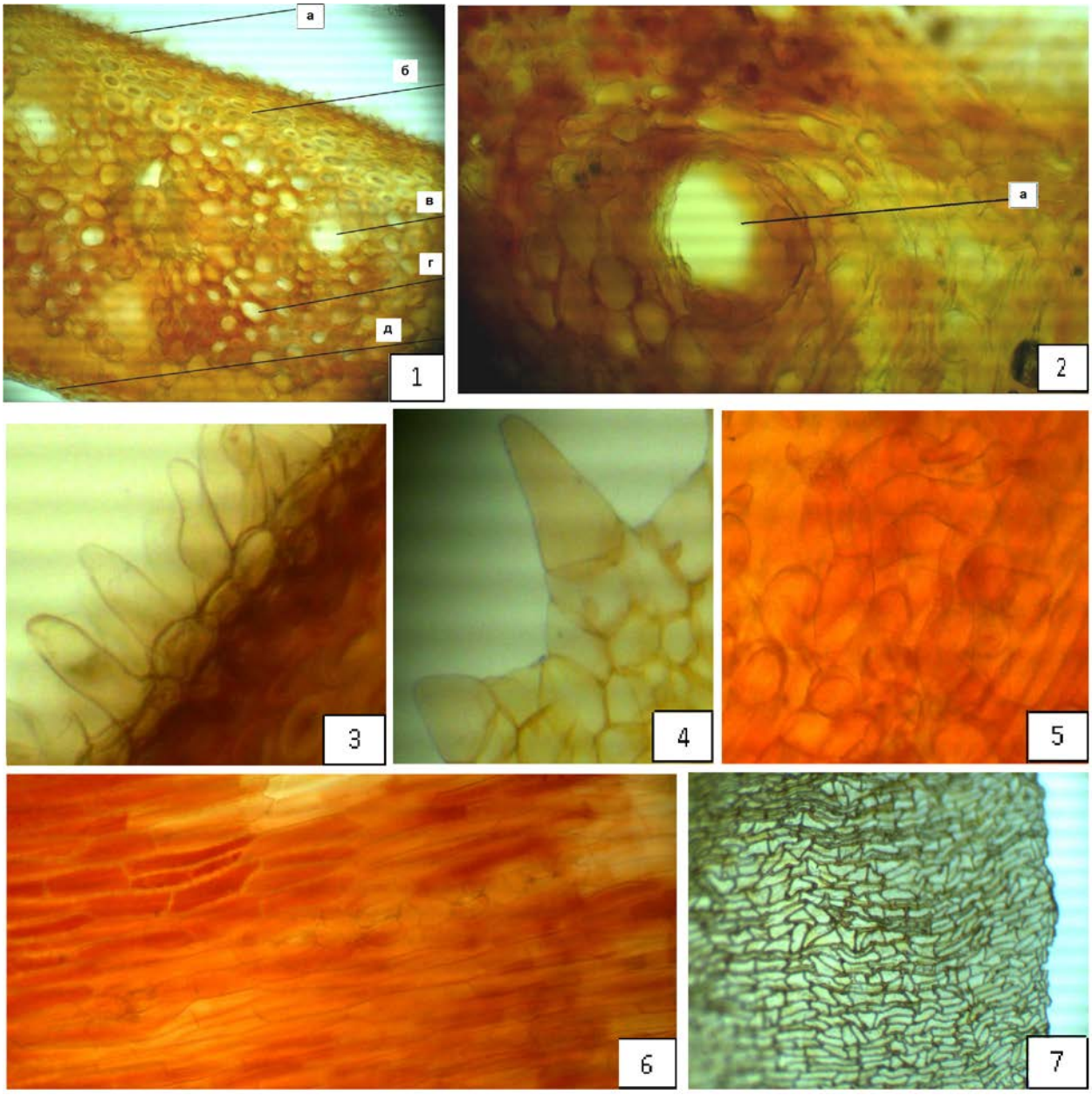


Рисунок 1 - Ели обыкновенной шишки

1 – поперечный срез семенной чешуи (160×): а – двухклеточные волоски; б – клетки склеренхимы; в – смоляные ходы; г – паренхимные клетки; д – клетки эпидермиса; 2 – смоляной ход (460×); 3 – эпидермис внутренней поверхности (640×); 4 – волоски кроющей чешуи (640×); 5 – волоски кроющей чешуи (640×); 6 – устьица кроющей чешуи (640×); 7 – клетки крыла семени (160×).

Клетки склеренхимы с сильно утолщёнными и полуодревесневшими оболочками. Количество слоёв склеренхимы от верхушки к основанию семенной чешуи увеличивается. В срединной части мезофилла расположены тонкостенные паренхиматозные клетки. У молодых шишек паренхимные

клетки зелёные, хлорофиллоносные, у более зрелых - коричневого, светло-коричневого цвета, часто смятые и сдавленные. В срединной части мезофилла расположены смоляные ходы и коллатеральные проводящие пучки (8 – 12 шт). Проводящие пучки сдавленные, мелкие в верхней части и более крупные у основания чешуи. Диаметр смоляных ходов увеличивается от верхушки к основанию чешуи.

Кутикула, содержимое смоляных ходов, а так же маслянистые включения, в виде мелких капель в клетках эпидермиса и мезофилла окрашиваются раствором судана III в оранжевый цвет.

В микропрепарате кроющей чешуи с поверхности должны быть видны: вытянутые клетки эпидермиса с четковидно-утолщенными оболочками. На верхушке чешуи и по краю – многоклеточные и реже одноклеточные простые волоски. В верхней части кроющей чешуи и вдоль центральной жилки должны быть видны мелкие устьица. На внешней поверхности кроющей чешуи одноклеточные, реже двухклеточные волоски продолговатой и конической формы. Волоски расположены на внешней поверхности вдоль центральной жилки ближе к основанию чешуи. У основания чешуи расположены 2, реже 3 смоляных хода, которые достигают половины длины чешуи.

В кожуре семени с поверхности должны быть видны толстостенные каменистые клетки с темно-коричневым содержимым. Клетки крыла семени вытянутые с четковидно-утолщенными оболочками.

Измельченное сырье. При рассмотрении поперечного среза частичек семенной чешуи должны быть видны клетки эпидермиса с обеих сторон, овальные, толстостенные, покрытые толстым слоем кутикулы.

На поверхности семенной чешуи расположены простые одноклеточные, реже двухклеточные волоски сосочковидной или конической формы. На внешней стороне волоски меньшего размера и расположены реже. Под эпидермисом с обеих сторон расположены 1 – 4 слоя механических клеток с сильно утолщенными и более или менее (в зависимости от стадии

развития шишки) одревесневшими оболочками, пронизанными тонкими порам. С внутренней стороны клетки эпидермиса с тонким слоем кутикулы, а под эпидермисом расположен слой склеренхимы. Клетки склеренхимы с сильно утолщенными и полуодревесневшими оболочками. В срединной части мезофилла расположены тонкостенные паренхиматозные клетки. Паренхиматозные клетки хлорофилловые, зелёные, у молодых шишек, и отмирающие коричневого, светло-коричневого цвета часто смятые и сдавленные, у более зрелых. В срединной части мезофилла расположены смоляные ходы и проводящие пучки.

Кутикула, содержимое смоляных ходов, а так же маслянистые включения, в виде мелких капель в клетках эпидермиса и мезофилла.

В препарате кроющей чешуи с поверхности должны быть видны: вытянутые клетки эпидермиса с четковидно-утолщенными оболочками. На верхушке чешуи и по краю – многоклеточные и реже одноклеточные простые волоски. В верхней части кроющей чешуи и вдоль центральной жилки должны быть видны мелкие устьица. На внешней поверхности кроющей чешуи видны одноклеточные, реже двухклеточные волоски продолговатой и конической формы. Волоски расположены на внешней поверхности вдоль центральной жилки ближе к основанию чешуи. У основания чешуи расположены 2, реже 3 смоляных хода, которые достигают половины длины чешуи. В кожуре семени с поверхности должны быть видны толстостенные каменистые клетки с темно-коричневым содержимым. Клетки крыла семени вытянутые с четковидно-утолщенными оболочками.

Определение основных групп биологически активных веществ

Приготовление растворов.

Желатина раствора 1 %. К 1,0 г желатина прибавляют 50 мл воды и оставляют на 1 час при частом встряхивании, затем воду сливают, а к желатину добавляют новую порцию 60 мл воды и растворяют, встряхивая и нагревая при температуре не выше 50 – 60 ºС. К полученному раствору желатина прибавляют 10,0 г натрия хлорида, перемешивают и после охлаждения раствор фильтруют в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Ели обыкновенной шишек отвар. Сырье, измельченное до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 10 мм, заливают водой комнатной температуры в соотношении 1:10 и настаивают в плотно закрытом инфундирном аппарате или в соответствующей емкости на кипящей водяной бане при частом перемешивании в течение 30 мин. Процеживают без предварительного охлаждения и упаривают наполовину. Отвар используют свежеприготовленным.

Тонкослойная хроматография

Ели обыкновенной шишек отвар (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором наносят в виде полосы 50 мкл (0,05 мл) испытуемого раствора. Пластинку с нанесенной пробой сушат на воздухе в течение 5 мин и помещают в хроматографическую камеру с уксусной кислотой 15 % и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат в вытяжном шкафу при комнатной температуре в течении 15 мин, выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100 – 105 °С в течение 10 мин, затем просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции сине-голубого цвета.

Затем хроматографическую пластинку обрабатывают алюминия хлорида раствором спиртовым 5 % и выдерживают при температуре 100 – 105 °С в течение 1-3 мин и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться зоны адсорбции (по возрастанию): сине-фиолетового цвета, с флуоресценцией темно-желтого цвета, с флуоресценцией желтого цвета и зона темного цвета.

Качественные реакции

1. На предметное стекло наносят 1 каплю отвара ели обыкновенной шишек, добавляют 1 каплю железа (III) аммония сульфата раствора 1 %, должно наблюдаться постепенное образование черно-зеленого окрашивания (дубильные вещества).

2. На предметное стекло наносят 1 каплю отвара ели обыкновенной шишек, добавляют 1 каплю желатина раствора; должно наблюдаться образование белого осадка (дубильные вещества).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 13 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 8 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1 %.

Измельченность сырья. *Измельченное сырье*. Частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 10 мм, не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, не более 5 %.

Посторонние примеси

Шишек, у которых половина или более семян высыпались. *Цельное сырье* – не более 20 %.

Других частей ели (хвоя, мелкие веточки и др.). *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 5 %.

Органической примеси. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1 %.

Минеральной примеси. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном

растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье*. Эфирного масла – не менее 0,2 %; экстрактивных веществ, извлекаемых водой – не менее 5 %; дубильных веществ – не менее 6 %.

Определение содержания эфирного масла проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1, из 20,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 5 мм, время перегонки 1,5 ч).

Определение дубильных веществ проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1, из навески 1,0 г сырья измельченного до размера частиц 3 мм).

Определение экстрактивных веществ проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье» (метод 2, экстрагент – вода, из навески 10,0 г сырья, измельченного до размера частиц 1 мм).

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных

препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Женьшеня настоящего корни **ФС.2.5.0013.15**

Panacis ginseng radices

Собранные в конце августа – начале сентября и высушенные корнидикорастущего и культивируемого многолетнего травянистого растения женьшеня настоящего – *Panax ginseng* С.А.Меу, сем. аралиевых – *Araliaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки.*Цельное сырье.* Корни длиной до 25 см, толщиной 0,7–2,5 см, с 2–5 крупными разветвлениями, реже –без них. Корни стержневые, продольно-, реже спирально-морщинистые, хрупкие, излом ровный. «Тело» корня утолщенное, почти цилиндрическое, сверху с ясно выраженными кольцевыми утолщениями. В верхней части корня имеется суженное поперечно-морщинистое корневище – «шейка». Корневище короткое с несколькими рубцами от опавших стеблей, наверху образует «головку», представляющую собой расширенный остаток стебля и верхушечную почку (иногда 2–3). От «шейки» иногда отходят один или несколько придаточных корней. «Шейка» и «головка» могут отсутствовать. Цвет корней с поверхности и на разрезе желтовато-белый, на свежем изломе белый. Запах характерный. Вкус водного извлечения сладкий, жгучий, затем пряно-горьковатый.

Измельченное сырье. При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки корней различной

формы, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет с поверхности и на изломе желтовато-белый. Запах характерный. Вкус водного извлечения сладкий, жгучий, затем пряно-горьковатый.

Порошок. При рассмотрении порошка под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видна смесь измельченных частиц корней разнообразной формы желтовато-белого цвета, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Запах характерный. Вкус водного извлечениясладкий, жгучий, затем пряно-горьковатый.

Микроскопические признаки.*Цельное сырье.* На поперечном срезе главного корня должны быть видны узкий слой светло-коричневой пробки, широкая кора, четкая линия камбия и древесина. Главный корень покрыт перидермой, клетки которой тонкостенные и лигнифицированные, неопробковевшие. Флоэма и ксилема разделены камбиальной зоной, которая проходит примерно через середину радиуса корня иногда не просматривается. К периферии от первичной ксилемы отходят крупноклеточные первичные радиальные лучи паренхимной ткани, между которыми находится вторичная ксилема, пересеченная многочисленными вторичными радиальными лучами основной паренхимы. Ксилема состоит из тонкостенных паренхимных клеток, содержащих крахмальные зерна. Сосуды сердцевинных лучей имеют утолщенные одревесневшие стенки и расположены поодиночке или собраны по 3 – 6 в группы. В паренхиме древесины изредка встречаются клетки, содержащие желтые пигменты. В центре корня есть нечетко диагностируемые остатки первичной ксилемы в виде 2 лучей. Флоэма состоит, главным образом, из мелкоклеточных элементов, в ней находятся хорошо заметные схизогенные вместилища, содержащие капельки секрета от светло-желтого до красно-коричневого цвета. Крахмальные зерна мелкие, округлые, простые. В отдельных клетках паренхимы содержатся друзы оксалата кальция. Наружная часть вторичной коры граничит с зоной из нескольких (4–6) рядов крупных тангентально-вытянутых паренхимных клеток феллодермы, округлыхили

овальных,имеющихслегка утолщенную оболочку.

На поперечном срезе придаточного корня в центре луч сосудов первичной ксилемы – остаток диархного проводящего пучка при первичном строении. Два сектора вторичной ксилемы разделены радиальными лучами основной паренхимы. Клетки паренхимы округлые или овальные, частично или полностью заполнены крахмальными зернами. Пробка состоит из 5 – 7 слоев прямоугольных, тонкостенных клеток, слабо лигнифицированных.

Измельченное сырье. При рассмотрении "давленого" препарата должны быть видны фрагменты поперечных и продольных срезов главного и придаточных корней.

Фрагменты главного корня представлены лучами и сосудами ксилемы, заполняющими клетками паренхимы сердцевинных лучей с крахмальными зернами, полостями канала и выстилающими клетками, клетками паренхимы с пигментами, клетками камбия.

Фрагменты придаточного корня представлены клетками пробки, паренхимой с крахмальными зернами, вместилищами, первичной и вторичной корой, сосудами, сердцевинными лучами.

Порошок. При рассмотрении микропрепарата видны фрагменты эпидермиса, пробки, древесины, паренхимы, а также друзы оксалата кальция.

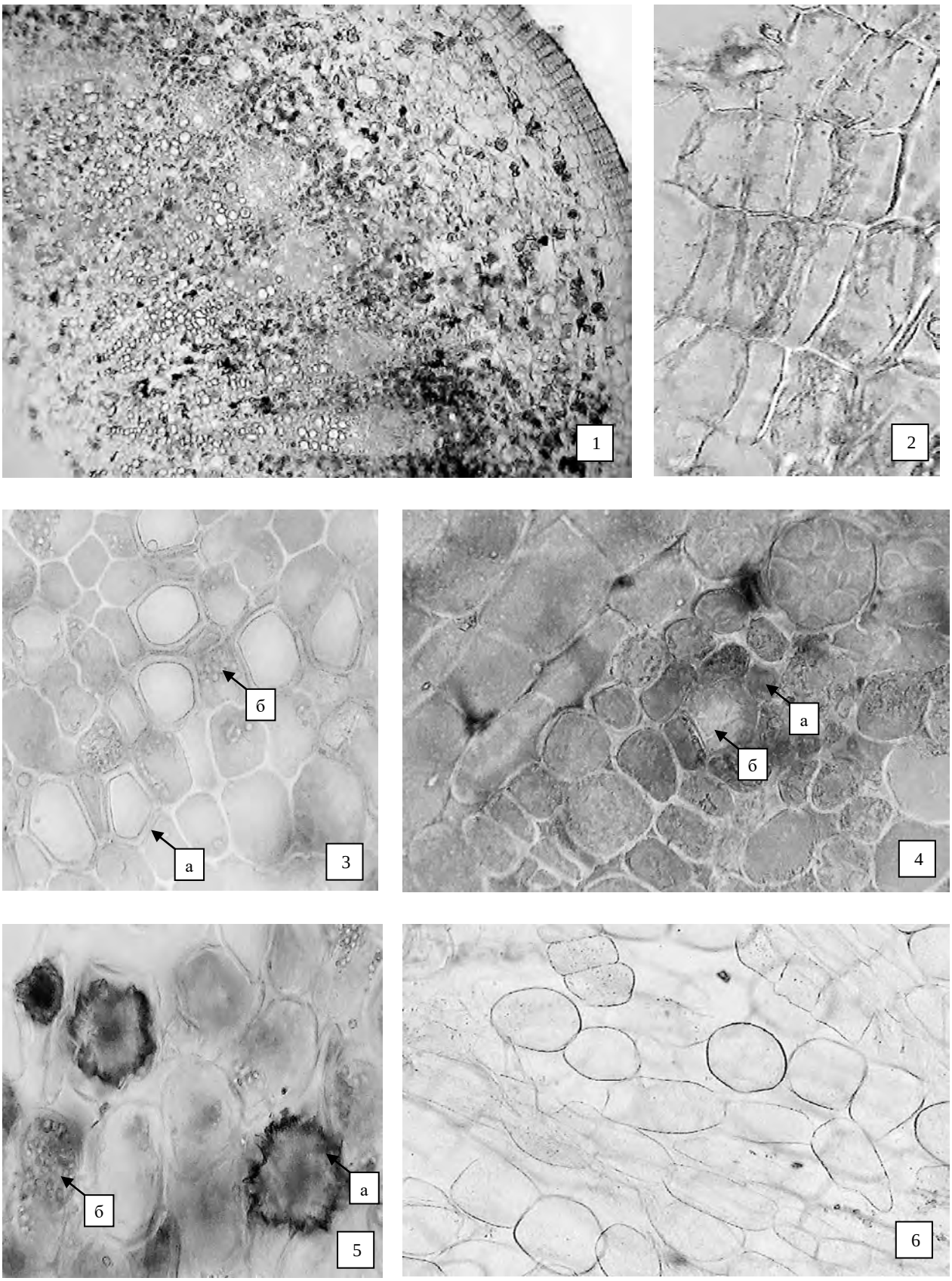


Рисунок – Женьшеня настоящего корни.
1 – фрагмент поперечного среза главного корня (100×); 2 – фрагмент пробки (400×); 3 – фрагмент поперечного среза придаточного корня: а – сосуды ксилемы, б – крахмальные зерна(400×); 4 – фрагмент поперечного среза

главного корня с секреторным каналом:а – выстилающие клетки канала,б – полость канала (400×); 5 – фрагмент паренхимы сердцевинных лучей: а – друзы оксалата кальция, б – крахмальные зерна (400×); 6 – клетки паренхимы сердцевинного луча (100×).

Определение основных групп биологически активных веществ

1. Тонкослойная хроматография

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 20 мкл испытуемого раствора (см. раздел «Количественное определение» приготовление раствора А испытуемого раствора) и 50 мкл раствора стандартного образца (СО)панаксозида Rg_1(см. раздел «Количественное определение» приготовление раствора А СО панаксозида Rg_1). Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщеннуюв течение не менее 2 ч смесью растворителей хлороформ – метанол–вода (26:14:3), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80–90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей. Хроматограмму обрабатываютфосфорновольфрамовой кислоты спиртовым раствором 20 % и нагревают в сушильном шкафу при 100–105 °Свтечение 3 мин, после чего просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО панаксозида Rg_1должна обнаруживаться зона адсорбции отсветло-розового до темно-розового цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должно обнаруживаться не менее 6 зон адсорбции от светло-розового до темно-розового цвета; доминирующей является зона на уровне зоны адсорбции СО панаксозида Rg_1; допускается обнаружение других зон адсорбции (панаксозиды).

2. ***Качественные реакции***

При нанесении на порошок корней женьшеня капли серной кислоты концентрированной через 1–2 мин появляется кирпично-красное окрашивание, переходящее в красно-фиолетовое, а затем в фиолетовое

окрашивание(панаксозиды).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность.*Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* – не более 13 %.

Зола общая.*Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* – не более 5 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте.*Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* – не более 2 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, –не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, –не более 5 %. *Порошок:*частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, –не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Корни, потемневшие с поверхности.*Цельное сырье,измельченное сырье* – не более 3 %.

Органическая примесь.*Цельное сырье,измельченное сырье* – не более 0,5 %.

Минеральная примесь.*Цельное сырье, измельченное сырье,порошок* – не более 1 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение.*Цельное сырье,измельченное сырье,порошок:*суммапанаксозидов в пересчете на панаксозид Rg_1–не менее 2 %; экстрактивные вещества, извлекаемые 70 % спиртом, –не менее 20 %.

Сумма панаксозидов

Приготовление растворов.

Раствор серной кислоты. К 45 мл воды осторожно, при перемешивании, добавляют 60 мл серной кислоты концентрированной.

Раствор СО панаксозида Rg_1. Около 0,03 г (точная навеска) СО панаксозида Rg_1 помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в небольшом количестве спирта 96 %, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (раствор АСОпанаксозида Rg_1). Срок годности раствора 30 сут.

1,0 мл раствора А СО панаксозида Rg_1 помещают в колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл серной кислоты раствора 70 % и нагревают на водяной бане в течение 10 мин (раствор Б СО панаксозида Rg_1). Срок годности раствора 30 сут.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл спирта 70 %. Колбу закрывают пробкой и взвешивают с точностью до ± 0,01.Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане (умеренное кипение) в течение 90 мин. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и при необходимости доводят до первоначальноймассы спиртом 70 %. Содержимое колбы тщательно перемешивают. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр («красная полоса») (раствор А испытуемого раствора).

5,0 мл раствора Аиспытуемого раствора помещают в фарфоровую

чашку и выпаривают на водяной бане досуха. Сухой остаток растворяют в 5–6 мл воды, количественно переносят на стеклянный фильтр со слоем полиамида высотой 1–1,5 см и элюируют 10–15 мл воды. Водный элюат отбрасывают. Затем слой полиамида элюируют спиртом 96 %, собирая элюат в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем растворараспиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора).

1,0 мл раствора Биспытуемого раствора помещают в колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл серной кислоты раствора 70 % и нагревают на водяной бане в течение 10 мин (раствор В испытуемого раствора). После охлаждения измеряют оптическую плотность раствора В испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 526 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.В качестве раствора сравнения используют спирт 96 %.

Параллельно определяют оптическую плотность раствораБСО панаксозида Rg_1в техже условиях.

Содержание суммы панаксозидов в пересчете на панаксозид Rg_1и абсолютно сухое сырье в процентах (*X*)вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 30 \cdot 10 \cdot 6 \cdot P \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot 25 \cdot 6 \cdot a \cdot 5 \cdot 1 \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot a_0 \cdot P \cdot 240}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где *A* – оптическая плотность раствора В испытуемого раствора;
A_0 – оптическая плотность раствора Б СО панаксозида Rg_1;
a – навеска сырья, г;
a_0 – навеска СО панаксозида Rg_1,г;
P– содержание основного вещества в СОпанаксозида Rg_1, %;
W – влажность сырья, %.

Допускается содержание суммы панаксозидовв пересчете на панаксозид Rg_1 вычислятьс использованием удельного показателя поглощенияпродуктов гидролизапанаксозида Rg_1 с раствором серной кислоты по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 30 \cdot 10 \cdot 6 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 5 \cdot 1 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 36000}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора В испытуемого раствора;

$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения продуктов гидролиза панаксозида Rg_1 с раствором серной кислоты при 526 нм, равный 25;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Экстрактивные вещества. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье» (метод 1, экстрагент – спирт 70 %).

Примечание.Определение суммы панаксозидов в пересчете на панаксозид Rg_1 проводят для сырья, предназначенного для производства лекарственных растительных препаратов (пачки, фильтр-пакеты); определение экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 70 %, и суммы панаксозидов в пересчете на панаксозид Rg_1– для сырья, предназначенного для производства настойки.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Жостера слабительного плоды **ФС.2.5.0014.15**

Rhamni catharticae fructus

Собранные осенью зрелые и высушенные плоды дикорастущего кустарника или небольшого дерева жостера слабительного (син.: крушина слабительная) –*Rhamnus cathartica* L., сем.крушиновых –*Rhamnaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Плоды – округлые костянки с блестящей морщинистой поверхностью, диаметром 5–8 мм, с небольшим малозаметным остатком столбика и с сохранившейся плодоножкой или углублением на месте ее отрыва. Мякоть коричневая с 3–4 (реже 2) темно-коричневыми косточками с твердой кожурой, трехгранной или яйцевидной формы. Цвет плодов от синевато-черного до почти черного, иногда с сизоватым налетом. Запах слабый, неприятный. Вкус водного извлечения сладковато-горький.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.*Эпидермиссостоит из мелких, толстостенных, полигональных клеток. На поверхности эпидермиса встречаются небольшие устьица, окруженные 3 рядами несколько сжатых клеток. При рассмотрении на поперечном срезе заметно, что наружная и внутренняя стенки эпидермальных клеток утолщены более боковых; колленхима представленанесколькими рядами клеток, из которых 2 наружных ряда состоят из крупных, толстостенных клеток с пигментом коричневого цвета; в паренхимемезокарпиярасполагается один ряд проводящих пучков, встречаются друзы оксалата кальция и одиночные или собранные группами идиобласты с коричневым содержимым,

расположенные вдоль проводящих пучков. Эндокарпий состоит из ряда мелких кристаллоносных клеток, покрывающих толстостенные склереиды, слоя волокон.

Кожура семени плода тонкая, плотно соединенная с эндокарпием. Эпидермис ее состоит из каменистых клеток, далее видна тонкостенная паренхима, заканчивающаяся у зародыша семени рядом клеток с заметной пористостью. Эндосперм и зародыш содержат в клетках алейроновые зерна и жирное масло.

Плодоножки покрыты эпидермисом с толстым слоем кутикулы, не опушены.

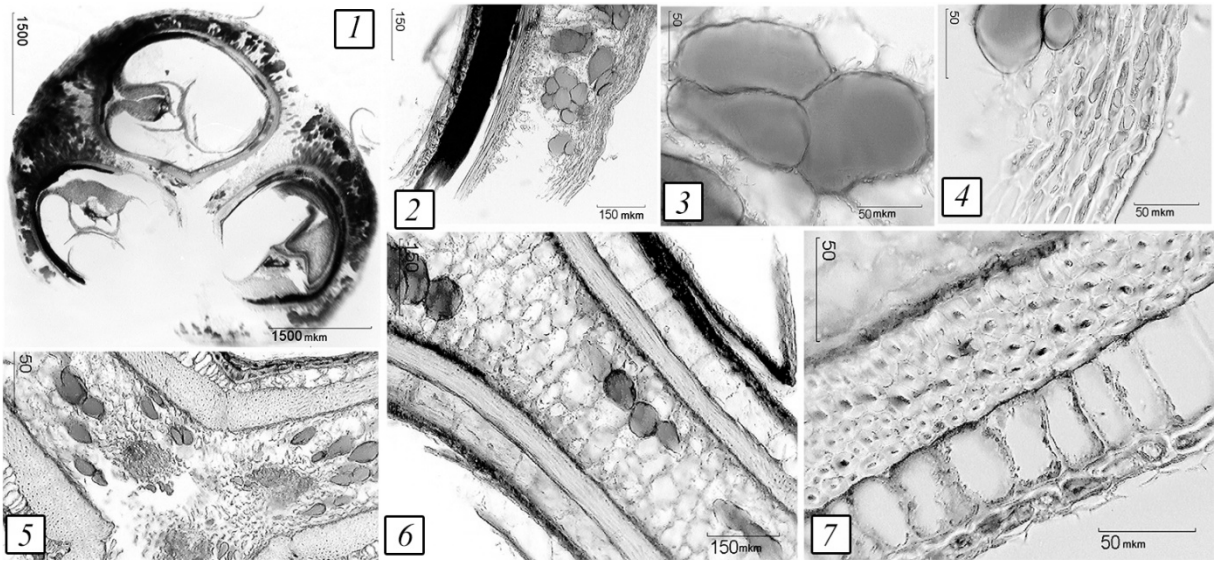


Рисунок 1–Плод жостера слабительного. Поперечный срез.
1 – общий вид с семенными полостями (40×); 2 – паренхима перегородки (100×); 3 – клетки паренхимы с пигментом (400×); 4 – экзокарпий (400×); 5 – сердцевина плода (100×); 6 – семенная перегородка (100×); 7 – склеренхима (400×).

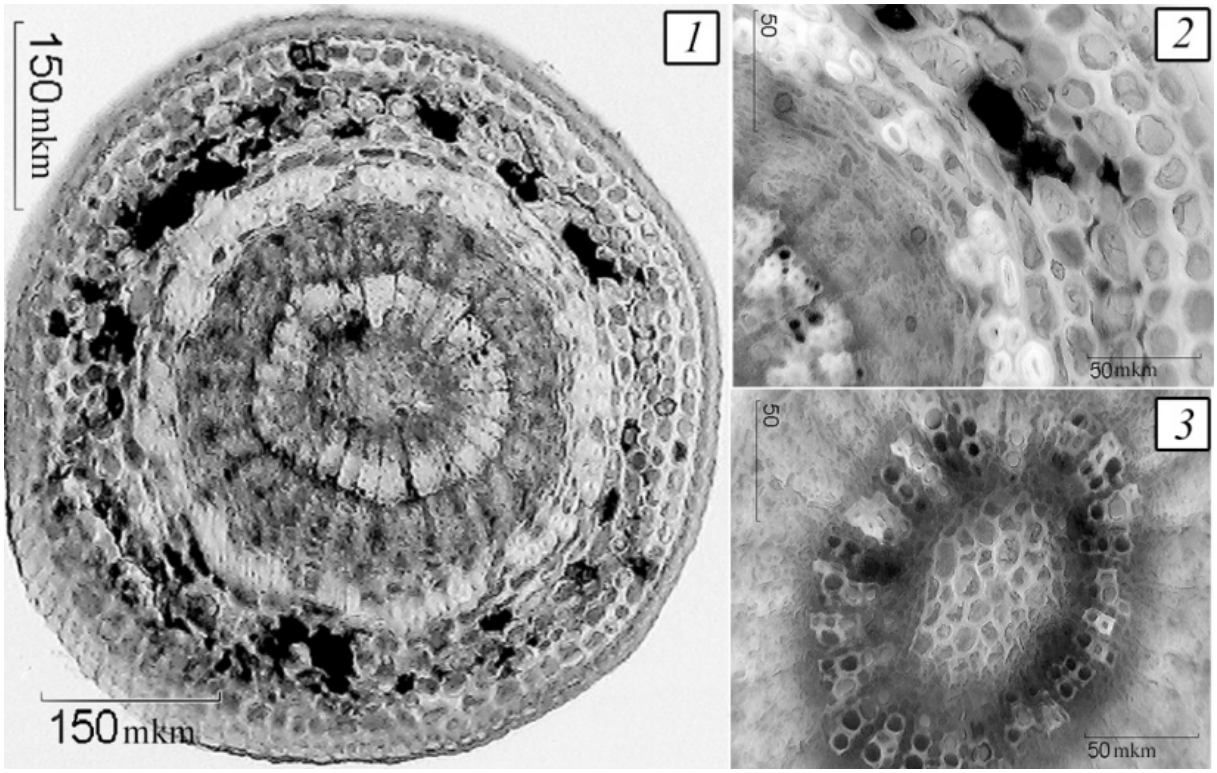


Рисунок2–Поперечный срез плодоножки жостера.
1 – Общий вид плодоножки (100×); 2 – фрагмент коровой части с пигментом и склеренхимой (400×); 3 – фрагмент сердцевины плодоножки.

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

*Раствор стандартного образца (СО) 3-О-рутинозидарамнетина.*Около 0,02 г СО3-О-рутинозидарамнетинарастворяют в 50 мл спирта 70 % при нагревании на водяной бане. Раствор используют свежеприготовленным.

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят по 20 мкл испытуемого раствора (см. раздел «Количественное определение» приготовление раствора А испытуемого раствора), раствора СО3-О-рутинозидарамнетина и раствора СО франгулина А(см. раздел «Количественное определение»приготовление раствора А СОфрангулина А.) Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщеннуюв течение 1 ч смесью растворителей хлороформ – метанол–вода (26:14:3),и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей

пройдет около 80 – 90 %длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителейи просматривают при дневном свете.

На хроматограмме растворовСО должна обнаруживаться зона адсорбции ярко-желтого цвета (3-О-рутинозид рамнетина) и над ней зона адсорбции оранжево-красного цвета (франгулин А).

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться зона адсорбции ярко-желтого цвета на уровне зоны адсорбции СО 3-О-рутинозидарамнетина изона адсорбции оранжево-красного цвета на уровне зоны адсорбции СО франгулина А; допускается обнаружение других зон адсорбции (антраценпроизводные).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность.*Цельное сырье*– не более 14 %.

Зола общая.*Цельное сырье*– не более 4 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте.*Цельное сырье*– не более 2 %.

Посторонние примеси

Недозрелые плоды.*Цельное сырье*– не более 4 %.

Подгоревшие плоды. *Цельное сырье* – не более 5 %.

Органическая примесь (посторонние плоды и веточки)*.Цельное сырье*– не более 2 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье* –не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырьеи лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС

«Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье:*сумма антраценпроизводных в пересчете на франгулин А – не менее 2,5 %,

Приготовление растворов.

Раствор СО франгулина А. Около 0,02 г (точная навеска) СО франгулина А помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 30 мл спирта 70 % при нагревании на водяной бане. После охлаждения содержимого колбы до комнатной температуры доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивают (раствор АСО франгулина А). Срок годности раствора 30 сут при хранении в хорошо укупоренной упаковке, в прохладном защищенном от света месте.

1,0 мл раствора А СО франгулина А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора щелочно-аммиачным раствором до метки и перемешивают затем раствор помещают в колбу вместимостью 100 мл, нагревают в течение 15 мин на водяной бане с обратным холодильником и охлаждают до комнатной температуры. (раствор Б СО франгулина А). Срок годности раствора 3 мес при хранении в хорошо укупоренной упаковке, в прохладном защищенном от света месте.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл спирта40 %, взвешивают с точностью до ± 0,01 г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане (умеренное кипение) в течение60 мин. После охлаждения колбу закрывают той же пробкой, снова взвешивают, восполняют недостающий экстрагент до первоначальноймассы, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр (раствор А испытуемого раствора).

1,0 мл раствора Аиспытуемого растворапомещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора щелочно-аммиачным раствором до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора). Раствор Б испытуемого раствора переносят в колбу вместимостью 50 мл, нагревают в течение 15 мин на водяной бане с обратным холодильником, а затем охлаждают до комнатной температуры.

Оптическую плотность раствора Биспытуемого раствора измеряют на

спектрофотометре при длине волны 524 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл раствора Аиспытуемого раствора доведенный щелочно-аммиачным раствором до метки в мерной колбе вместимостью 50 млперемешивают и обрабатывают аналогично раствору Б испытуемого раствора.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО франгулина А на спектрофотометре при длине волны 524 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл спирта 70 %доведенный щелочно-аммиачным раствором до метки в мерной колбе вместимостью50 мл,перемешивают и обрабатывают аналогично раствору Б СО франгулина А.

Содержание суммы антраценпроизводных в пересчете на франгулин Аи абсолютно сухое сырье в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 50 \cdot 50 \cdot P \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot 50 \cdot 25 \cdot a \cdot 1 \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot a_0 \cdot P \cdot 200}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Биспытуемого раствора;
A_o – оптическая плотность раствора БСО франгулина А;
a– навеска сырья, г;
a_o – навеска СО франгулина А, г;
P – содержание франгулина А в СО, %;
W – влажность сырья, %.

Допускается содержание суммы антраценпроизводныхв пересчете на франгулин А вычислять с использованием удельного показателя поглощения франгулина А со щелочно-аммиачным раствором по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 50 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 250000}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где A– оптическая плотность раствора Биспытуемого раствора;
$A_{1см}^{1\%}$ –удельный показатель поглощения франгулина А со щелочно-аммиачным раствором при длине волны 524 нм, равный 180;
a–навеска сырья, г;
W–влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Зверобоя трава ФС.2.5.0015.15

Hyperici herba

Собранная в фазу цветения и высушенная трава дикорастущего и культивируемого многолетнего растения зверобоя продырявленного *Hypericum perforatum* L., и зверобоя пятнистого (зверобоя четырехгранного) *Hypericum maculatum* Crantz (*H. quadrangulum* L.), сем. зверобойных – *Hypericaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Верхние части стеблей с листьями, цветками, бутонами и недозрелыми плодами. Стебли полые, цилиндрические, длиной до 50 см, с 2 (у зверобоя продырявленного) или 4 (у зверобоя пятнистого) продольными ребрами. Листья супротивные, сидячие, продолговатые или продолговато-овальные, цельнокрайние, голые, до 3,5 см, шириной до 1,4 см. У зверобоя продырявленного листья с многочисленными просвечивающимися вместилищами в виде светлых точек. Цветки многочисленные, около 1–1,5 см в диаметре, собраны в щитковидную метелку. Чашечка сростнолистная, глубокопятираздельная, чашелистики ланцетовидные, тонко заостренные (у зверобоя продырявленного) или продолговато-овальные (у зверобоя пятнистого). Венчик раздельнолепестной, в 2–3 раза длиннее чашечки, лепестков 5. Тычинки многочисленные, сросшиеся у основания нитями в 3 пучка. Плод – трехгнездная многосемянная коробочка.

Цвет стеблей – от зеленовато-желтого до серовато-зеленого, иногда розовато-фиолетовый; листьев – от серовато-зеленого до темно-зеленого; лепестков – ярко-желтый или желтый с темными точками, хорошо заметными под лупой; плодов – зеленовато-коричневый. Запах слабый, характерный.Вкус водного извлечения горьковатый, слегка вяжущий.

Измельченное сырье. Различной формы кусочки стеблей, листьев, цветков, недозрелые плоды и их части, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.

При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки цветоносов и стеблей, чаще в продольном сечении, беловатые в изломе, снаружи – от светло-зеленого до коричневого цвета; кусочки листьев от серовато-зеленого до коричневого цвета с хорошо заметными на поверхности темно-коричневыми, иногда почти черными точками (вместилища); части бутонов желтовато-коричневого цвета; лепестки, их кусочки желтого, беловато-желтого и желто-коричневого цвета с хорошо заметными, почти черными округлыми точками или образованиями овальной формы; отдельные чашелистики и их части, изредка – недозрелые плоды зеленовато-коричневого цвета.

Цвет измельченного сырья от серовато- или желтовато-зеленого до темно-зеленого, с зеленовато-желтыми, желтыми, зеленовато-коричневыми, редко – розовато-фиолетовыми и коричневыми вкраплениями. Запах слабый, характерный. Вкус водного извлечения горьковатый, слегка вяжущий.

Порошок. Кусочки стеблей, листьев, цветков, бутонов, недозрелые плоды и их части, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

При рассмотрении порошка под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки цветоносов и стеблей, чаще в продольном сечении, беловатые в изломе, снаружи – от светло-зеленого до коричневого цвета; кусочки листьев от серовато-зеленого до коричневого цвета с хорошо заметными на поверхности темно-коричневыми, иногда

почти черными точками (вместилища); части бутонов желтовато-коричневого цвета; лепестки, их кусочки желтого, беловато-желтого и желто-коричневого цвета с хорошо заметными, почти черными округлыми точками или образованиями овальной формы; отдельные чашелистики и их части, изредка – недозрелые плоды зеленовато-коричневого цвета.

Цвет порошка от серовато-зеленого до темно-зеленого и зеленовато-коричневого с многочисленными белыми, желтовато-белыми, желтыми и коричневыми вкраплениями. Запах слабый, характерный.Вкус водного извлечения горьковатый, слегка вяжущий.

Микроскопические признаки.*Цельное сырье, измельченное сырье.* При рассмотрении микропрепаратов листа с поверхности в мезофилле должны быть видны вместилища 3 типов: округлые бесцветные по всей поверхности, вместилища с маслянистым содержимым – удлиненные вдоль жилок и округлые по краю, округлые и овальные темно-фиолетовые пигментированные вместилища по краю листа; эпидермис листа представлен клетками с извилистыми стенками с четковидными утолщениями; устьица, окруженные 3–4 клетками, одна из которых значительно меньше других (анизоцитный тип), встречаются только на нижней стороне листа; фрагменты эпидермиса стебля, клетки которого продольно вытянутые с четковидным утолщением стенок, с устьицами анизоцитного типа; элементы цветка– чашелистики и лепестки –с такими же диагностическими признаками, как у листьев, кроме того клетки лепестков содержат оранжевые хромопласты и имеют сильноизвилистые стенки; тычинки с 2 пыльниками, несущими гладкие пыльцевые зерна с 3 порами, эпидермис тычиночных нитей со складчатой кутикулой, мезофилл – с оранжевыми хромопластами.

При рассмотрении «давленого» препарата створок коробочки должны быть видны продольно-вытянутые клетки эпидермиса с толстыми пористыми стенками, нередко с округлыми пигментированными образованиями, расположенными на стыке смежных клеток; в мезокарпии встречаются

вместилища с бесцветным и пигментированным маслянистым содержимым; эндокарпий состоит из удлиненных клеток с утолщенными пористыми стенками.

*Порошок.*При исследовании микропрепаратов должны быть видны фрагменты листовой пластинки с эпидермисом из клеток с извилистыми четковидно-утолщенными стенками и устьицами, окруженными 3–4 клетками, одна из которых значительно меньше других (анизоцитный тип); в некоторых кусочках видны вместилища 2 типов: крупные округлые или овальные пигментированные, содержащие темно-фиолетовый пигмент, и бесцветные просвечивающие, обычно более мелкие, продольно вытянутые над жилками.

Встречаются фрагменты чашелистиков, цветков с вместилищами и четковидным утолщением стенок клеток эпидермиса, фрагменты стеблей в продольном сечении с эпидермисом из клеток с прямыми, четковидно-утолщенными стенками. Часто встречаются трудно распознаваемые частицы сырья, в том числе фрагменты листовых пластинок в поперечном сечении.

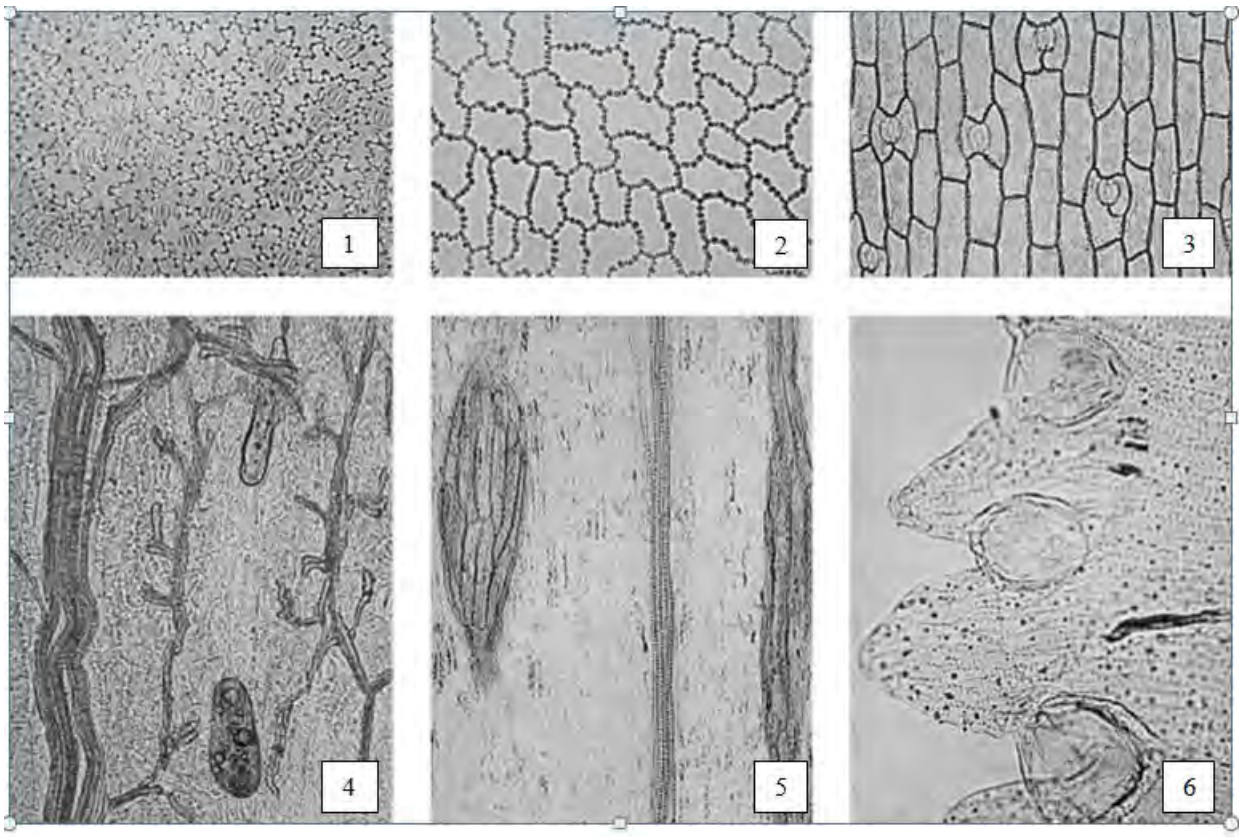


Рисунок –Зверобоя трава.

1 – фрагмент эпидермиса листа (нижняя сторона): четковидные утолщения стенок клеток и устьица анизоцитного типа (200×), 2 – фрагмент эпидермиса листа (верхняя сторона) счетковидным утолщением стенок клеток (200×), 3 – фрагмент эпидермиса стебля: четковидные утолщения стенок клеток и устьицаанизоцитного типа (200×), 4 – фрагмент мезофилла чашелистика: вытянутые вместилищас маслянистым содержимым (200×), 5 – фрагмент эпидермиса створок плодов с продольно-вытянутыми клетками над вместилищем с бесцветным содержимым (200×), 6 – фрагмент верхушки лепестка: бесцветное вместилище между зубчиками, округлые хромопласты (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

1. Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) рутина. Около 0,005 г СО рутина (рутина тригидрата) растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности растворане более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около 1,0 г измельченного сырья до размера частиц, проходящих

сквозь сито с отверстиями размером 1 мм,помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл спирта 96 % и нагревают с обратным холодильником на водяной бане. После охлаждения извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 10 мкл испытуемого раствора и 5 мкл раствора СО рутина. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 60 мин смесью растворителей этилацетат – муравьиная кислота безводная – вода (85:10:5) и хроматографируют восходящим способом. После прохождения фронтом растворителей не менее 80 – 90 % длины пластинки от линии старта,ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей. Пластинку последовательно обрабатываютдифенилборной кислоты аминоэтилового эфира раствором 1% в спирте 96 %и макрогола 400 раствором спиртовым 5 %, выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100-105 ºС в течение 3–5 мин и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО рутина должна обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией желтого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться зоны адсорбции с флуоресценцией: оранжевого или желтого цвета на уровне зоны СО рутина, над ней зона адсорбцииоранжевого или желтого цвета, выше нее зона адсорбцииголубого цвета и над ней 2 зоны адсорбции желтого или зеленовато-желтого цвета; допускается обнаружение других зон адсорбции (флавоноиды).

2. Качественные реакции

Около 1,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, кипятят в течение 2-3 мин с 20 мл воды, охлаждают и фильтруют. К 2 мл фильтрата прибавляют 2 мл

железа(III) аммония сульфата раствора 10 %; должно наблюдаться черно-зеленое окрашивание (дубильные вещества).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* – не более 13 %.

Зола общая.*Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* – не более 8 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* – не более 1 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм,– не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, –не более 5 %. *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, –не более 5%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, –не более 5 %.

Посторонние примеси

Сырье, изменившее окраску (потемневшее и почерневшее).*Цельное сырье,измельченноесырье* – не более 3 %.

Стебли (в том числе отделенные при анализе).*Цельное сырье,измельченноесырье* – не более 50 %.

Органическая примесь*.Цельное сырье,измельченное сырье* – не более 1 %.

Минеральная примесь.*Цельное сырье, измельченное сырье,порошок* – не более 1 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение.*Цельное сырье,измельченное сырье,порошок:*суммафлавоноидов в пересчете на рутин –не менее 1,5 %.

Приготовление растворов.

Раствор СО рутина. Около 0,05 г (точная навеска) СО рутина, предварительно высушенного при температуре 130–135 °С в течение 3 ч, растворяют в 85 мл спирта 96 % в колбе вместимостью 100 мл при нагревании на водяной бане, охлаждают, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор А СО рутина). Срок годности не более 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

1,0 мл раствора А СО рутина, 2 мл алюминия хлорида раствора 2 % в спирте 96 %, 0,1 мл уксусной кислоты разведенной 30% доводят спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл и перемешивают. (раствор Б СО рутина).

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл спирта 50 %. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане в течение 30 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Горячее извлечение фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл так, чтобы частицы сырья не попадали на фильтр. В колбу для экстрагирования прибавляют 30 мл спирта 50 %. Экстракцию повторяют еще дважды в описанных выше условиях, фильтруют извлечение в ту же мерную колбу. После охлаждения объем извлечения доводят спиртом 50 % до метки

и перемешивают (раствор А испытуемого раствора).

1,0 мл раствора А испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл,2 мл алюминия хлорида раствора 2 % в спирте 96 %, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора).

Оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора измеряют через 40 мин на спектрофотометре при длине волны 415 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл раствора Аиспытуемого раствора и 0,1 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, доведенный спиртом 50 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО рутина в таких же условиях. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл раствора А СО рутина, 0,1 мл уксусной кислоты разведенной 30 % и доведенный спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в абсолютно сухом сырье в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 100 \cdot 1 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot 100 \cdot 25 \cdot 1 \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot a_0 \cdot P \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
A_o – оптическая плотность раствора Б СО рутина;
a – навеска сырья, г;
a_o – навеска СО рутина, г;
P – содержание основного вещества в СО рутина, %;
W – влажность сырья, %.

Допускается содержания суммы флавоноидов в пересчете нарутинвычислять с использованием удельного показателя поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)} \frac{A \cdot 250000}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где *A* – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$–удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при длине волны 415 нм, равный 248;

a – навеска сырья, г;

W –влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Земляники лесной листья **ФС.2.5.0016.15**

Fragariae vescae folia

Собранные в фазу цветения, высушенные листья дикорастущего многолетнего травянистого растения земляники лесной – *Fragaria vesca* L., сем.розоцветных – *Rosaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки.*Цельное сырье.* Листья сложные цельные или частично измельченные, тройчатые, с остатком черешка длиной до 1 см. Отдельные листочки сложного листа длиной от 1,5 до 6 см, шириной от 1,6 до 4 см. Средний листочек на коротком черешке, яйцевидной или ромбической формы, боковые листочки округлоромбические с крупными, треугольными или почти округлыми зубцами с каждой стороны, конечный зубец листочка несколько ỳже соседних зубцов и не выдается над ними. Жилкование перистое. Жилки, средняя и первого порядка, сильно выступающие с нижней стороны листочков. Цвет сверху зеленый или темно-зеленый, снизу серовато-зеленый.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×)на листочках заметны сероватые волоски (редкие на верхней стороне и более многочисленные на нижней поверхности). Волоски прямые или изогнутые у основания, направленные к верхушке листа.С нижней стороны листа выступают жилки желтоватого цвета. Черешок густо покрыт сероватыми волосками. Запах слабый. Вкус водного извлечения горьковатый, слегка вяжущий.

Измельченное сырье. Кусочки листьев различной формы и черешков, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки листьев зеленого или серовато-зеленого цвета и фрагменты черешка серовато-зеленого цвета. На фрагментах листовых пластинок заметны сероватые волоски (редкие на верхней стороне и более многочисленные на нижней поверхности) и выступающие с одной стороны листа желтоватые жилки. Фрагменты черешка густо покрыты сероватыми волосками. Цвет зеленый или серовато-зеленый. Запах слабый. Вкус водного извлечения горьковатый, слегка вяжущий.

Порошок. Кусочки листьев и черешков, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны фрагменты листьев зеленого или серовато-зеленого цвета и фрагменты черешка серовато-зеленого цвета. На фрагментах листовых пластинок заметны сероватые волоски (редкие на верхней стороне и более многочисленные на нижней поверхности) и выступающие с одной стороны листа желтоватые жилки. Фрагменты черешка густо покрыты сероватыми волосками. Цвет зеленый или серовато-зеленый. Запах слабый. Вкус водного извлечения горьковатый, слегка вяжущий.

Микроскопические признаки.*Цельное, измельченное сырье.* При рассмотрении микропрепаратов листа с поверхности должны быть видны клетки верхнего эпидермиса 5–7-угольные, со слабо извилистыми боковыми стенками, местами имеют четковидные утолщения; клетки нижнего эпидермиса более извилистостенные. Устьица округлые, погруженные, окружены 4 – 6 околоустьичными клетками (аномоцитный тип), расположены, в основном, на нижнем эпидермисе. Замыкающие клетки устьиц имеют почковидную форму. Встречаются волоски простые и головчатые. Простые волоски многочисленные, особенно на нижней стороне листа, прямые или изогнутые у основания, направленные к верхушке листа,

одноклеточные, толстостенные, с ровной или слегка волнистой поверхностью. Полость волоска расширенная у основания, суживается в кончике до нитевидной.

Головчатые волоски встречаются преимущественно на нижней стороне листа, на верхней – редко, тонкостенные, имеют 2–3-клеточную ножку и 1-клеточную головку.Головка продолговатоовальная или шарообразная, иногда со светло-коричневым содержимым. В местах прикрепления волосков клетки эпидермиса образуют розетку. В паренхиме листа, особенно вдоль жилок, содержатся включения оксалата кальция преимущественно в виде друз, реже –в виде ромбических кристаллов.

Клетки эпидермиса черешка прозенхимной формы, 5–7-угольные, с прямыми стенками, вытянуты вдоль черешка. Волоски эпидермиса черешка простые и головчатые, имеют строение, аналогичное волоскам листа. В паренхиме черешка, особенно вдоль жилок, встречаются друзы оксалата кальция.

*Порошок.*При рассмотрении микропрепаратов порошка должны быть видны фрагменты эпидермиса с извилистыми клетками верхнего эпидермиса и нижнего эпидермиса, местами имеющими четковидные утолщения; устьица аномоцитного типа, округлые, погруженные, окружены 4 – 6 околоустьичными клетками (аномоцитный тип), расположены, в основном, на нижнем эпидермисе. Замыкающие клетки устьиц имеют почковидную форму. Волоски простые – многочисленные прямые или изогнутые у основания, одноклеточные, толстостенные, с ровной или слегка волнистой поверхностью, с расширенной у основания полостью, суживающейся в кончике до нитевидной; фрагменты паренхимы листа с жилками и включениями оксалата кальция преимущественно в виде друз, реже - в виде ромбических кристаллов.

Встречаются фрагменты клеток эпидермиса черешка прозенхимной формы, 5–7-угольные, с прямыми стенками; с простыми одноклеточными,

толстостенными волосками с ровной поверхностью, заостренными на верхушке и друзами оксалата кальция.

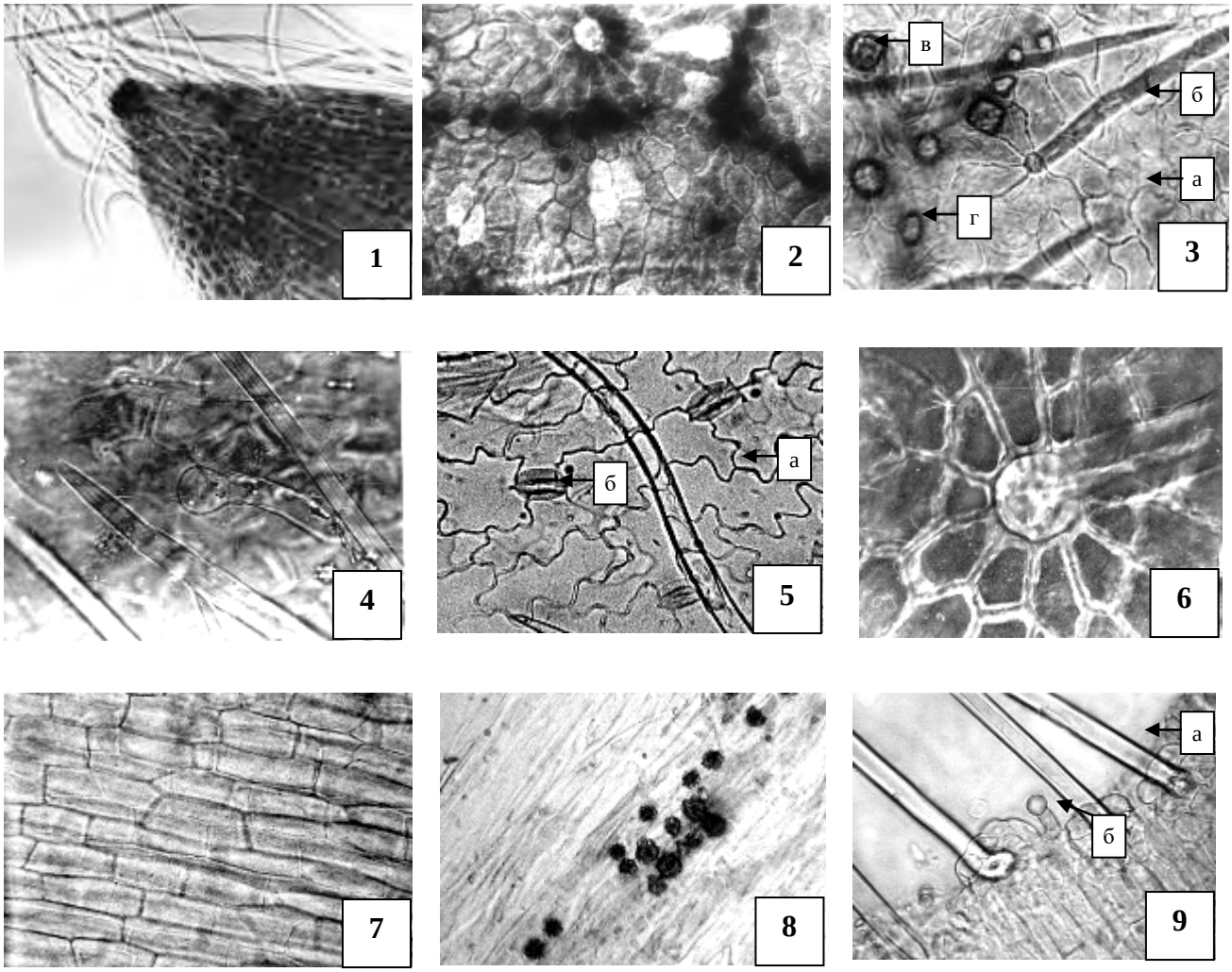


Рисунок – Земляники лесной листья.

1 – фрагмент эпидермиса листа с простыми волосками, направленными к верхушке (90×); 2 – клетки верхнего эпидермиса со слабоизвилистыми стенками (140× 140); 3 – клетки нижнего эпидермиса с извилистыми стенками (а), простые волоски (б), друзы (в) и ромбические кристаллы (г) оксалата кальция (280×); 4 – фрагмент нижнего эпидермиса листа с головчатым (а) и простыми (б) волосками (280×);5 – фрагмент нижнего эпидермиса листас извилистыми стенками (а) и устьицами аномоцитного типа (б) (300×); 6 – розетка эпидермальных клеток вокруг основания простого волоска (280×); 7 – фрагмент клеток эпидермиса черешка с прямыми стенками (300×); 8 – фрагмент эпидермиса черешка с друзами (140×); 9 – фрагмент эпидермиса черешка с простыми (а) и головчатыми (б) волосками (140×)

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 70 мкл испытуемого раствора (см. раздел «Количественное определение. Сумма флавоноидов» приготовление раствора А испытуемого раствора) и 5 мкл раствора стандартного образца (СО) рутина (см. раздел «Количественное определение. Сумма флавоноидов» приготовление раствора А СО рутина). Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камерусо смесью растворителей: этилацетат– муравьиная кислотабезводная– вода (70:15:15) ихроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около80– 90% длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушатдо удаления следов растворителей и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СОрутина должна обнаруживаться зона адсорбции темного цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться не менее 4 зон адсорбции темного цвета: одна на уровне зоны адсорбции СО рутина, одна ниже и 2 выше нее; допускается обнаружение других зон адсорбции.

Затем пластинку обрабатывают алюминия хлорида спиртовым раствором 5 %, нагревают при температуре 100 – 105 °С в сушильном шкафу в течение 2 – 3 мин, после чего просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СОрутина должна обнаруживаться зона адсорбции желтого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться не менее 4 зон адсорбции с флуоресценцией желтого цвета: одна на уровне зоны адсорбции СО рутина, одна ниже и 2 выше нее; допускается обнаружение других зон адсорбции (флавоноиды).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* – не более 13 %.

Зола общая.*Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* – не более 10 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте.*Цельное сырье, измельченное сырье,порошок* – не более 3 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, – не более 5 %.*Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %.*Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Сырье,изменившееокраску (пожелтевшее и потемневшее).*Цельное сырье,измельченное сырье* – не более 2 %.

Другие части земляники.*Цельное сырье,измельченное сырье* – не более 5 %.

Органическая примесь.*Цельное сырье,измельченное сырье* – не более 1 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье,порошок* – не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок:* сумма флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 1 %; экстрактивных веществ, извлекаемых водой, – не менее 25 %.

Сумма флавоноидов.

Приготовление растворов.

Раствор СО рутина. Около 0,05 г (точная навеска) СО рутина, предварительно высушенного при температуре 130 – 135 °С в течение 3 часов, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 85 мл спирта 70 % и нагревают на водяной бане до полного растворения. Затем охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора до метки тем же спиртом и перемешивают (растворАСО рутина).

1,0 мл раствора А СО рутина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл алюминия хлорида раствора 5 % в спирте 70 % и через 10 мин 1 мл уксусной кислоты раствора 3 %, объем раствора доводят тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор Б СО рутина).

Срок годности растворов 30 сут при хранении в хорошо укупоренной упаковке, в прохладном, защищенном от света месте.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм.Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл спирта 70 % и взвешивают с погрешностью ± 0,01 г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на водяной бане в течение 1,5 ч, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и при необходимости доводят до первоначальной массы спиртом 70 %. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр, смоченный тем же спиртом, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А испытуемого раствора).

2,0 мл раствора Аиспытуемого растворапомещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл алюминия хлорида раствора 5 % в спирте 70 % и через 10 мин 1 мл уксусной кислоты раствора 3 %,объем

раствора доводят тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор Б испытуемогораствора).

Оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора измеряют через 30 мин на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2,0 мл раствора А испытуемого раствор, 1 мл уксусной кислоты раствора 3 %, доведенный спиртом 70 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измерят оптическую плотность раствора Б СО рутина в таких же условиях. В качестве раствора сравнения используютраствор, состоящий из 1,0 мл раствора А СО рутина, 1 мл уксусной кислоты раствора 3 %, доведенный спиртом 70 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot a_0 \cdot 1 \cdot P \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 2 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot a_0 \cdot P \cdot 50}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где*A*– оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;

A_o– оптическая плотность раствораБСО рутина;

a– навеска сырья, г;

a_o навеска СО рутина, г;

P–содержание основного вещества в СО рутина, %;

W– влажность сырья, %.

Допускается содержание суммы флавоноидовв пересчете нарутин вычислять с использованием удельного показателя поглощения комплексарутина с алюминия хлоридомпо формуле:

$$X = \frac{A \cdot 125000}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где*A*– оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ –удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при длине волны 410 нм, равный 260;

a– навеска сырья, г;

W– влажность сырья, %.

Экстрактивные вещества. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1, экстрагент - вода).

Примечание. Определение суммы флавоноидов в пересчете нарутин и экстрактивных веществ, извлекаемых водой, проводят для сырья, предназначенного для производства лекарственных растительных препаратов (пачки, фильтр-пакеты).

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Змеевика корневища	**ФС.2.5.0074.18**
Bistortae rhizomata	**Взамен ГФ XI ст. 71**

Собранные после отцветания, очищенные от корней, остатков листьев и стеблей, отмытые от земли и высушенные корневища дикорастущих многолетних травянистых растений змеевика большого (горца змеиного) – *Bistorta major S. F. Gray* (*Polygonum bistorta* L.) и змеевика мясо-красного (горца мясокрасного) – *Bistorta carnea* (C. Koch) Kom. (*P. carneum* C. Koch), сем. гречишных – *Polygonaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Корневище твердое, змеевидно-изогнутое, несколько сплюснутое, с поперечными кольчатыми утолщениями и следами обрезанных корней. Длина корневища 3 – 10 см, толщина 1,5 – 2 см. Цвет пробки темный, красновато-бурый; на изломе – розоватый или коричневато-розовый, излом ровный. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения сильно вяжущий.

Измельченное сырье. Кусочки корневищ различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет корневищ в изломе коричнево-розовый, цвет пробки темный, красновато-коричневый. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения сильно вяжущий.

Порошок. Кусочки корневищ различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Цвет от розоватого до коричнево-розового с темными, красновато-коричневыми вкраплениями. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения сильно вяжущий.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении поперечного среза должно быть видно, что корневище имеет пучковый тип строения. Покровная ткань состоит из 6 – 8 рядов клеток пробки, имеющих темно-коричневую окраску. Проводящие пучки открытые коллатеральные, овальной или веретеновидной формы в сечении, расположены кольцом. С наружной (со стороны флоэмы) и внутренней (со стороны ксилемы) стороны к пучкам примыкают небольшие группы слабоутолщенных, слегка одревесневших склеренхимных волокон. Основная паренхима должна состоять из округлых клеток, образующих крупные, особенно в сердцевине, межклетники (аэренхима). В клетках паренхимы должны быть видны мелкие простые крахмальные зерна и очень крупные друзы кальция оксалата.

Измельченное сырье и порошок. При рассмотрении давленого препарата должны быть видны: группы паренхимных клеток, содержащих друзы кальция оксалата и крахмальные зерна, фрагменты сосудов (точечных, сетчатых, лестничных), фрагменты пробки. Вдоль сосудов могут быть видны фрагменты склеренхимных волокон, фрагменты аэренхимы.

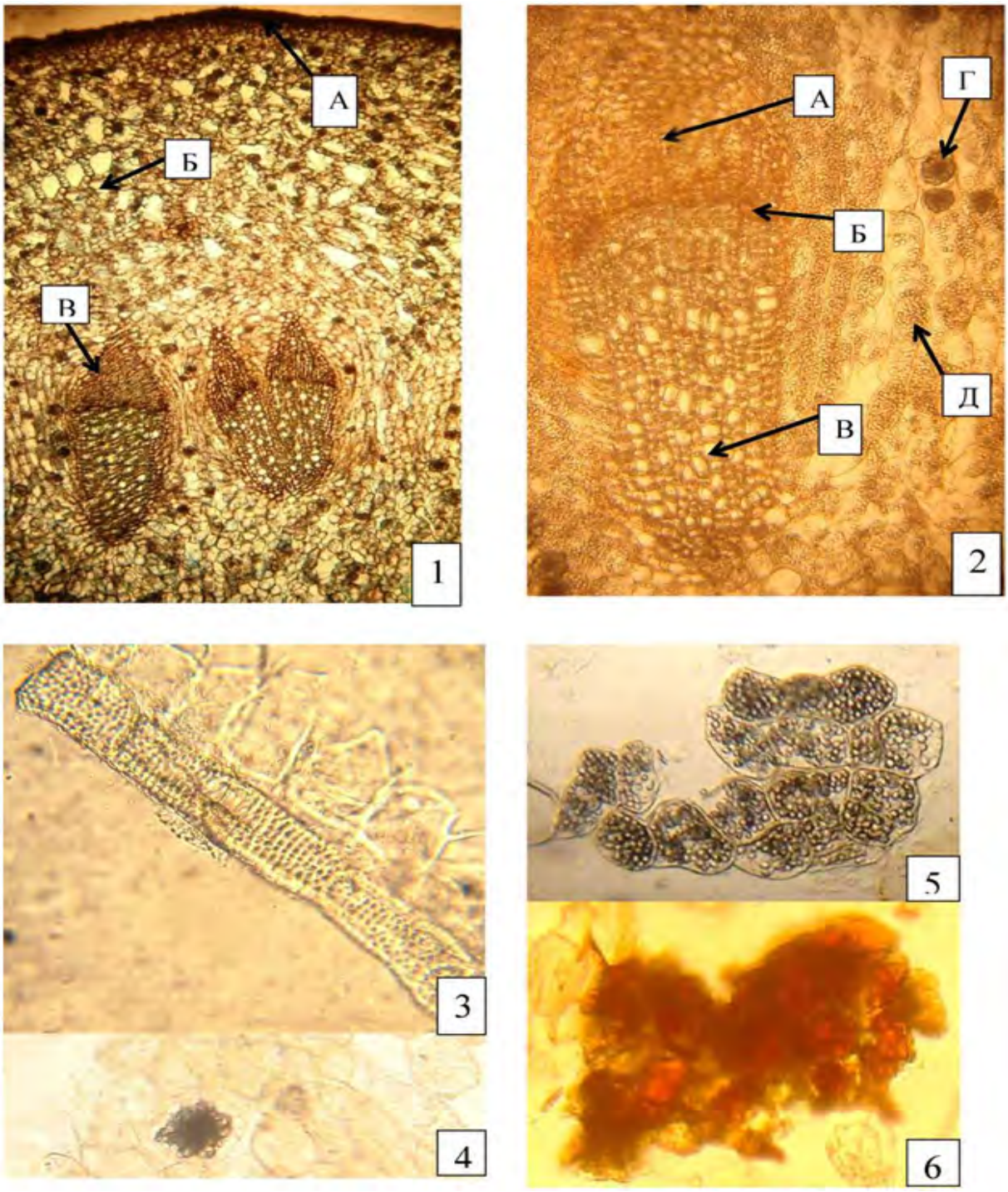


Рисунок – Змеевика корневища.
1 – фрагмент поперечного среза корневища (40×): А – пробка, Б – крупные межклетники аэренхимы, В – открытые коллатеральные проводящие пучки; 2 – фрагмент поперечного среза корневища (100×): А – элементы флоэмы, Б – камбий, В – сосуды древесины, Г – друзы кальция оксалата, Д – клетки паренхимы с крахмальными зернами; 3 – фрагменты сосудов (400×); 4 – клетки паренхимы с друзами кальция оксалата (200×); 5 – клетки паренхимы с крахмальными зернами (100×); 6 – фрагмент пробки (100×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Приготовление растворов.

Раствор для детектирования 1. 25 мл сульфаниловой кислоты раствора 0,3 % в хлористоводородной кислоты растворе 8 % смешивают перед обработкой с 1,5 мл нитрита натрия раствора 5 %. Срок годности раствора не более суток при хранении на льду.

Раствор для детектирования 2. Натрия карбоната раствор 10 %. Срок годности раствора не более 1 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор для детектирования 3. Раствор ванилина 5 % в спирте 95 % смешивают непосредственно перед обработкой с хлористоводородной кислотой концентрированной в соотношении 4:1. Срок годности раствора не более 24 ч при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор стандартного образца (СО) галловой кислоты. 0,05 г СО галловой кислоты растворяют в 50 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 1 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор СО хлорогеновой кислоты. 0,05 г СО хлорогеновой кислоты растворяют в 50 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор СО (+)-катехина. 0,05 г СО (+)-катехина растворяют в 25 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 1 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Тонкослойная хроматография

а) Около 5,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл спирта 96 %, нагревают на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 10 мин. После охлаждения до комнатной температуры полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 25 мл. Экстракцию повторяют еще раз, извлечение фильтруют в ту же мерную колбу, доводят раствор водой до метки (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 5 мкл (0,005 мл) испытуемого раствора и по 2 мкл (0,002 мл) растворов СО галловой кислоты и хлорогеновой кислоты.

Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 40 мин смесью растворителей этилацетат – толуол – кислота муравьиная безводная – вода (30:10:5:2), и хроматографируют восходящим способом.

Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей.

Хроматограмму обрабатывают раствором для детектирования 1, сушат, затем обрабатывают раствором для детектирования 2, сушат и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО галловой кислоты должна обнаруживаться зона адсорбции синего цвета.

На хроматограмме раствора СО хлорогеновой кислоты должна обнаруживаться зона адсорбции желто-коричневого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться зона адсорбции синего цвета на уровне зоны адсорбции СО галловой кислоты, зона адсорбции желто-коричневого цвета на уровне зоны адсорбции СО хлорогеновой кислоты; допускается обнаружение других зон адсорбции.

б) На линию старта аналитической хроматографической пластинки на полимерной подложке со слоем силикагеля размером 10 × 10 см наносят 5 мкл испытуемого раствора (см. раздел «а») и 2 мкл раствора СО (+)-катехина. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 40 мин смесью растворителей бутанол – уксусная безводная кислота – вода (40:10:28), и хроматографируют восходящим способом.

Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов

растворителей, затем обрабатывают раствором для детектирования 3, сушат и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО (+)-катехина должна обнаруживаться зона адсорбции малиново-розового цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться зона адсорбции малиново-розового цвета на уровне зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО (+)-катехина; допускается обнаружение других зон адсорбции малиново-розового цвета.

Качественная реакция

К 1 мл отвара корневищ (1:10) прибавляют 2 – 3 капли железа(III) аммония сульфат раствора 1 %; должно наблюдаться черно-синее окрашивание (дубильные вещества).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 13 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 9 %.

Зола, нерастворимая в 10% хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 1 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм – не более 5 %. *Измельченное сырье* – частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %. *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Корневищ, почерневших в изломе. *Цельное сырье, измельченное сырье*

– не более 5 %.

Кусочков корней, листьев, стеблей. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 0,5 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 1 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок:* дубильных веществ в пересчете на танин – не менее 15 %.

Определение дубильных веществ проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1, из навески 2,0 г сырья измельченного до величины частиц 2 мм).

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Золототысячника трава **ФС.2.5.0075.18**

Centaurii herba **Взамен ГФ XI ст. 48**

Собранная в фазу цветения и высушенная трава одно-, двухлетних дикорастущих и культивируемых травянистых растений: золототысячника обыкновенного – *Centaurium erythraea Rafn [syn.: Centaurium minus Moench, Centaurium umbellatum Gilib., Erythraea centaurium (L.) Borkh]* и золототысячника красивого – *Centaurium pulchellum (Sw.) Druce [syn.: Erythraea pulchella (Sw.) Hornem*], сем. горечавковых - *Gentianaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Стебли голые, простые или разветвленные, четырехгранные, иногда с крылатыми ребрами. Листья сидячие, супротивные, с пятью жилками, средние – продолговато-яйцевидные, голые, цельнокрайние, с пятью жилками, верхние – продолговато- или линейно-ланцетные. Соцветия верхушечные, щитковидные. Цветки правильные. Чашечка сростнолистная с пятью долями. Венчик с длинной цилиндрической трубкой и пятираздельным отгибом. Тычинок пять. Цвет стеблей, листьев и чашечки желтовато-зеленый, венчика – розовато-фиолетовый, желтовато-розовый и желтый. Запах слабый. Вкус водного извлечения горький.

Измельченное сырье. Кусочки стеблей, листьев и цветков различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет светлый от желтовато-зеленого до серовато-зеленого, светло-коричневого с желтыми, желтовато-розовыми, розовато-фиолетовыми и белыми вкраплениями. Запах слабый. Вкус водного извлечения горький.

Порошок. Кусочки стеблей, листьев и цветков различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Цвет светлый от желтовато-зеленого до серовато-зеленого, светло-коричневого с желтыми, желтовато-

розовыми, розовато-фиолетовыми и белыми вкраплениями. Запах слабый. Вкус водного извлечения горький.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье, измельченное сырье.* При рассмотрении листа с поверхности должны быть видны клетки эпидермиса обеих сторон с извилистыми стенками и складчатой кутикулой. Клетки эпидермиса нижней стороны листа отличаются меньшими размерами и более извилистыми стенками. По краю листа должны быть видны сосочковидные выросты. Устьица с обеих сторон листа, в большем числе на нижней, должны быть окружены 2-3 околоустьич-ными клетками (анизоцитный тип), на нижней стороне листа золототысячника красивого должны встречаться устьица диацитного типа.

В клетках мезофилла листа должны быть видны мелкие одиночные призматические кристаллы оксалата кальция, иногда - крестообразно-сросшиеся кристаллы и реже мелкие друзы.

При рассмотрении чашелистиков с поверхности и давленого препарата стебля должны быть видны прямоугольные вытянутые клетки эпидермиса с прямыми стенками. Устьица анизоцитного типа, на чашелистиках устьица расположены с наружной стороны. Эпидермис лепестков прямоугольно-вытянутый с извилистыми стенками и со складчатой кутикулой. В микропрепарате также обнаруживаются пыльцевые зерна округлой формы с тремя порами.

В «давленом» микропрепарате стебля должны быть видны склеренхимные волокна и узкие сосуды с окаймленными порами, а также спиральные и сетчатые сосуды.

Порошок. При рассмотрении микропрепаратов должны быть видны: фрагменты листовой пластинки с эпидермисом, состоящим из клеток с извилистыми стенками, складчатой кутикулой и устьицами анизоцитного типа; фрагменты эпидермиса лепестков с прямоугольно-вытянутыми клетками с извилистыми стенками и со складчатой кутикулой; фрагменты эпидермиса стебля с прямоугольными вытянутыми клетками эпидермиса с прямыми

стенками; фрагменты мезофилла с мелкими одиночными призматическими кристаллами и мелкими друзами оксалата кальция, фрагменты склеренхимных волокон и узких сосудов с окаймленными порами, а также фрагменты спиральных и сетчатых сосудов.

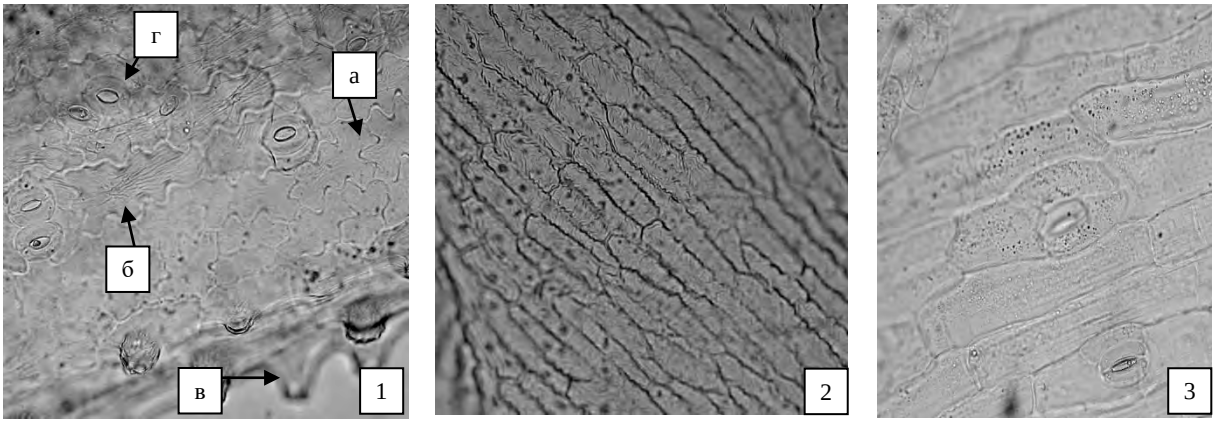


Рисунок – Золототысячника трава

1 – фрагмент листа: а – клетки эпидермиса с извилистыми стенками, б – складчатая кутикула, в – сосочковидные выросты по краю листа, г – устьица анизоцитного типа (200×), 2 – фрагмент эпидермиса венчика со складчатой кутикулой (200×), 3 – фрагмент эпидермиса наружной стороны чашелистика с устьицами анизоцитного типа (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор для детектирования 1. 1,0 г дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира растворяют в 100 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор для детектирования 2. 5 мл полиэтиленгликоля 400 смешивают со 100 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 6 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор стандартного образца (СО) рутина. Около 0,005 г рутина растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около 1,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, помещают в колбу вместимостью

100 мл, прибавляют 10 мл спирта 96 % и нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 5 мин. После охлаждения извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля в виде полос длиной 10 мм, шириной не более 3 мм наносят 5 мкл испытуемого раствора и параллельно 3 мкл раствора СО рутина.

Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре в течение 5 мин, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 40 мин смесью растворителей этилацетат – муравьиная кислота безводная – вода (65:15:20), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, пластинку вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей.

Затем хроматограмму последовательно опрыскивают раствором для детектирования 1, а затем раствором для детектирования 2, выдерживают в сушильном шкафу при 105 - 110 ºС в течение 3 – 5 мин и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО рутина должна обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией желтого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться: зона адсорбции с флуоресценцией желтого цвета на уровне зоны СО рутина, зона адсорбции с флуоресценцией желтого цвета ниже уровня зоны СО рутина, зона адсорбции с флуоресценцией голубого цвета выше уровня зоны СО рутина; допускается обнаружение других зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 14 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 7 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 1,5 %.

Измельченность сырья. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,25 мм, – не более 5 %. *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси.

Корни, в том числе отделенные при анализе. *Цельное сырье* – не более 2 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 1 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок:* суммы ксантонов в пересчете на алпизарин – не менее 1,5 %.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм.

Около 0,8 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл спирта 60 %. Колбу взвешивают с погрешностью ± 0,01 г, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане в течение 2 ч. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры и взвешивают, при необходимости доводят до первоначальной массы спиртом 60 %. Содержимое колбы фильтруют через бумажный складчатый фильтр, отбрасывая первые 25 мл фильтрата (раствор А).

2,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 3 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 %, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б).

Через 30 - 40 мин измеряют оптическую плотность раствора Б на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2,0 мл раствора А и 0,1 мл уксусной кислоты концентрированной, доведенный спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы ксантонов в пересчете на алпизарин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 25 \cdot 50 \cdot 100}{A_{\text{cm}}^{1\%} \cdot a \cdot 2 \cdot (100 - W)},$$

где: A – оптическая плотность раствора Б;

$A_{cm}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса алпизарина с алюминия хлоридом при длине волны 410 нм, равный 239;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Календулы лекарственной цветки **ФС.2.5.0030.15**

Calendulae officinalis flores

Собранные в начале распускания трубчатых цветков и высушенные цветочные корзинки культивируемого однолетнего травянистого растения календулы лекарственной–*Calendula officinalis* L., сем. астровых – *Asteraceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Цельные или частично осыпавшиеся корзинки диаметром до 5 см, без цветоносов или с остатками цветоносов длиной не более 3 см. Обвертка серовато-зеленая, одно-, двухрядная; листочки ее линейные, заостренные, густоопушенные. Цветоложе слегка выпуклое, голое. Краевые цветки язычковые, длиной 15–28 мм, шириной 3–5 мм с изогнутой короткой опушенной трубкой, трехзубчатым отгибом, вдвое превышающим обвертку, и 4–5 жилками. Цветки расположены в 2–3 ряда у немахровых и в 10–15 рядов у махровых форм. Пестик с изогнутой нижней одногнездной завязью, тонким столбиком и двухлопастным рыльцем. Срединные цветки трубчатые с пятизубчатым венчиком. Изредка встречаются недозрелые плоды и их кусочки различной формы.

Цвет краевых цветков красновато-оранжевый, оранжевый, ярко- или бледно-желтый; срединных – оранжевый, желтовато-коричневый или желтый; незрелых плодов – зеленый, серовато-зеленый, желтовато-зеленый, желтовато-коричневый и коричневый. Запах слабый.Вкус водного извлечения солоновато-горький.

Измельченное сырье. Смесь кусочков цветоложа, язычковых, трубчатых цветков, листочков обвертки и их фрагментов, цветоносов, изредка кусочков недозрелых плодов проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм.

При просмотре под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны: кусочки цветоложа голые, часто с сохранившимися остатками обвертки по краю; язычковые цветки на верхушке трехзубчатые, обычно с оборванным трубчатым основанием; трубчатые цветки пятизубчатые, часто нераскрывшиеся (в виде бутонов); густоопушенные листочки обвертки серовато-зеленого цвета, узкие ланцетовидные с более светлой полосой по краю и слегка выступающей главной жилкой; цилиндрические кусочки цветоносов. Цвет язычковых цветков красновато-оранжевый, оранжевый, ярко-желтый или бледно-желтый; трубчатых цветков светло-желтый, желтый; листочков обвертки серовато-зеленый; незрелых плодов – зеленый, серовато-зеленый, желтовато-зеленый, желтовато-коричневый и коричневый; цветоложа – светло-серый, зеленовато- или коричневато-серый; цветоносов – серовато-зеленый.

Цвет измельченного сырья зеленовато-желтый с вкраплениями серовато-зеленого, красновато-оранжевого, оранжевого, светло-желтого, зеленого, желтовато-коричневого и коричневого цвета. Запах слабый. Вкус водного извлечения солоновато-горький.

Порошок. Смесь частиц ноготков цветков проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны: кусочки краевых язычковых цветков ланцетной формы с длинным отгибом, оранжевого или желтого цвета, с 3 зубчиками, с изогнутой коротко опушенной трубкой; цельные длинные (3–5 мм) трубчатые цветки, преимущественно их части, пятизубчатые, оранжево-желтого или желтого цвета; фрагменты сероватого цветоложа, кусочки густоопушенной обвертки зеленовато-серого цвета, с плотной темной срединной жилкой и пленчатым

полупрозрачным краем, изредка кусочки плодов зеленого, серовато-зеленого, желтовато-зеленого, желтовато-коричневого и коричневого цвета; кусочки серовато-зеленых цветоносов, редко семена.

Цвет порошка зеленовато-желтый с вкраплениями серовато-зеленого, красновато-оранжевого, оранжевого, светло-желтого, зеленого, желтовато-коричневого и коричневого цвета. Запах слабый. Вкус водного извлечения солоновато-горький.

Микроскопические признаки. *Цельное, измельченное сырье.* При рассмотрении микропрепарата язычковых цветков с поверхности должны быть видны удлиненные клетки эпидермиса с оранжевыми округлыми хромопластами и покрыты ярко выраженной кутикулой; с хорошо заметными мелкими друзами оксалата кальция в мезофилле цветка; на зубчиках эпидермис с сосочками, иногда с устьицами; трубка венчика густо опушена одно-, двухрядными волосками; завязь также опушена: с выпуклой стороны железистыми, по краям вогнутой стороны - простыми двухрядными волосками; фрагменты цветоложа с головчатыми волосками, их обломками или местами их прикрепления в виде 2 базальных тонкостенных клеток восьмеркообразной формы. Головка железистых волосков состоит из 2, 4 или 8 клеток. Эпидермис трубчатых цветков такой же, как у язычковых, но у зубчиков он с более вытянутыми сосочками; нижняя часть трубки венчика и завязь густо опушены одно-, двухрядными железистыми, реже двухрядными простыми волосками. Складчатость кутикулы, обычно маскируемая хромопластами, просматривается только на отдельных участках. Пыльца округлая и округло-трех-, четырехгранная шиповатая трех-четырехпоровая. Эпидермис листочков обвертки по краю представлен удлиненными клетками с прямыми стенками, в средней части - извилистыми стенками и устьицами, устьица аномоцитного типа; листочки обвертки густо опушены: по краю – длинными одно-, двухрядными простыми, двухрядными железистыми и ветвистыми волосками; в средней части – только железистыми волосками.

*Порошок.*При рассмотрении порошка должны быть видны: фрагменты эпидермиса язычковых и трубчатых цветков с удлиненными клетками и оранжевыми округлыми хромопластами; отдельные железистые волоски с двух-, четырех- или восьмиклеточной головкой и одно-, реже двухрядные простые волоски или их обломки; фрагменты тычиночных нитей, состоящих из почти квадратных клеток с утолщенными стенками; фрагменты эпидермиса густоопушенных листочков обвертки с прямыми или извилистыми стенками с устьицами и длинными одно-, двухрядными железистыми, простыми и ветвистыми волосками; мелкие друзы оксалата кальция в мезофилле; пыльца округлая и округло-трех-, четырехгранная шиповатая трех-четырехпоровая.

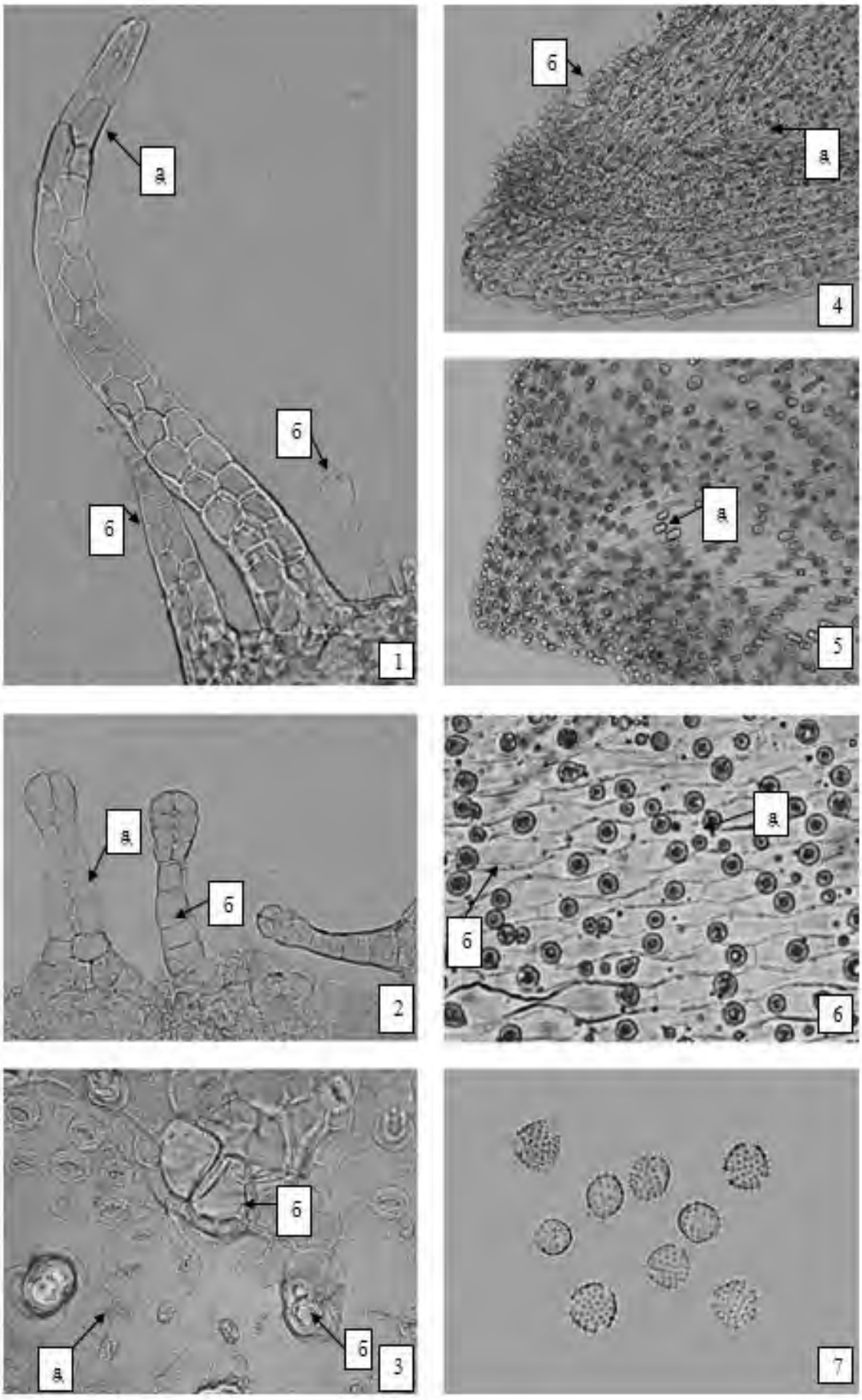


Рисунок – Ноготков лекарственных цветки.

1 – фрагмент эпидермиса завязи трубчатого цветка: а – простой многоклеточный двухрядный волосок, б – двухрядные железистые волоски (200×); 2 – фрагмент эпидермиса завязи язычкового цветка: а – железистый двухрядный волосок, б – железистый однорядный волосок (200×);3 – фрагмент эпидермиса листочка обвертки: а – устьица, б – 2-3-клеточные основания обломанных волосков (200×); 4 – фрагмент зубчика венчика трубчатого цветка: а – мелкие маслянистые капли в клетках мезофилла, б – сосочковидные выросты клеток эпидермиса (200×); 5 –фрагмент зубчика отгиба язычкового цветка: а – маслянистые капли в клетках мезофилла (200×); 6 –фрагмент отгиба язычкового цветка: а – маслянистые капли в клетках мезофилла, б – складчатость кутикулы эпидермиса (400×); 7 – округлые пыльцевые зерна с шиповатой экзиной и тремя порами (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

1. Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) рутина. Около 0,005 г рутина (рутина тригидрата) растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

*Раствор СО хлорогеновой кислоты.*Около 0,001 г хлорогеновой кислоты растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

*Раствор СО кофейной кислоты.*Около 0,001 г кофейной кислоты растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 меспри хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор СО β-каротина. Около0,02 г СО β-каротина растворяют в 100 мл хлороформа и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

а) Около 1,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл спирта 70 %, нагревают с обратным холодильником на водяной бане в течение 30 мин. После охлаждения до комнатной температуры извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 20 мкл испытуемого раствора и параллельно в одну полосу 5 мкл раствора СО рутина и по 10 мкл растворов

СО хлорогеновой и кофейной кислот. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре в течение 5 мин, помещают в камеру, предварительно насыщенную не менее 30 мин смесью растворителей муравьиная кислота безводная - вода - этилацетат (10:10:80) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100 – 105 °С в течение 2 – 3 мин и еще теплую обрабатывают последовательно дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира раствором 1% в спирте96 % и макрогола 400 раствором спиртовым 5 %. Через 30 мин после обработки пластинку просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме растворов СО рутина, СО хлорогеновой кислоты и СО кофейной кислоты должны обнаруживаться: флуоресцирующая зона адсорбции желтого, желто-оранжевого или оранжевого цвета (рутин) и над ней зона адсорбции с флуоресценцией голубого цвета (хлорогеновая кислота), выше нее зона адсорбциис флуоресценцией голубого цвета (кофейная кислота).

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться:2 зоны адсорбции с желтой, зелено-желтой или коричнево-желтой флуоресценцией ниже и на уровне зоны адсорбции СО рутина; зоны адсорбции с голубой флуоресценцией на уровне зоны адсорбции СО хлорогеновой кислоты и на уровне зоны адсорбцииСО кофейной кислоты; допускается обнаружение других зон адсорбции (фенольные соединения).

б) Около 1,0 гсырья,измельченного до величины частиц,проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещают в колбу вместимостью 50 мл, приливают 10 мл хлороформа, кипятят на водяной бане с обратным холодильником в течение 10 мин и охлаждают. Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр выпариваютнаводянойбане досуха, затем растворяют в 1 мл хлороформа (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 30 мкл испытуемого раствора и 20 мкл раствора СО β-каротина. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в хроматографическую камеру, предварительно насыщенную в течение 1 ч смесью растворителей гексан–бензол (85:15), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80–90% длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры и сушат до удаления следов растворителей, просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО β-каротина должна обнаруживаться зона адсорбции желто-оранжевого цвета.

Нахроматограммеиспытуемогорастворадолжнаобнаруживатьсязонаадсорбции желтого или желто-оранжевого цвета науровнезоныадсорбцииСОβ-каротина; допускаетсяобнаружениедополнительныхзонадсорбциижелто-оранжевогоцветаниже уровня зоны СО β-каротинаизоныадсорбциинастарте; допускается обнаружение других зон адсорбции (каротиноиды).

2. Качественные реакции

К 2 мл растворАиспытуемого раствор (см. раздел «Количественное определение») приливают 1 мл воды, затем осторожно по стенке прибавляют 1 мл ванилина раствора в серной кислоте, на границе слоев должно наблюдаться образование окрашивания красновато-коричневого цвета в виде кольца (тритерпеновые соединения).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* – не более 14 %.

Зола общая. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* – не более 11 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* –не более 5 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье:*частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %. *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Остатки цветоносов, в том числе отделенные от корзинок при анализе.*Цельное сырье* –не более 6 %.

Корзинки с полностью осыпавшимися язычковыми и трубчатыми цветками (цветоложе с обвертками). *Цельное сырье* –не более 20 %.

Сырье, изменившее окраску (потемневшее и почерневшее). *Цельное сырье,измельченное сырье* **–**не более 3 %.

Другие части растения (кусочки стеблей, листьев). *Цельное сырье, измельченное сырье* **–**не более 3 %.

Органическая примесь.*Цельное сырье,измельченное сырье* **–** не более 0,5 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* **–** не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок:*суммы флавоноидов в пересчете на рутин, –не менее 1 %; экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 70 %, –не менее 35 %; экстрактивных веществ, извлекаемых водой, – не менее 35 %.

Сумма флавоноидов

Приготовление растворов.

Раствор СО рутина. Около 0,05 г(точная навеска) рутина, предварительно высушенного при 130–135 °С в течение 3 ч, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и растворяют при нагревании на водяной бане в 85 мл спирта 96 %, охлаждают, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор А СО рутина). Срок годности растворане более 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

1,0 мл раствора А СО рутина, 0,1 мл уксусной кислоты, 5 мл алюминия хлоридаспиртового раствора 2 %, помещаютв мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят спиртом 96 % до метки (раствор Б СО рутина). Срок годности растворане более 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм.Около 1,0 г (точная навеска) измельченногосырья помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл спирта 70 %, взвешивают с погрешностью ± 0,01 г и оставляют на 1 ч. Затем колбу присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на водяной бане, поддерживая слабое кипение в течение 2 ч. После охлаждения колбу с содержимым вновь закрывают той же пробкой, взвешивают и содержимое колбы при необходимости восполняют растворителем. Содержимое колбы тщательно взбалтывают и фильтруют через сухой бумажный фильтр, отбрасывая первые 20 мл (раствор А испытуемого раствора).

1,0 мл растворАиспытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл алюминия хлорида спиртового

раствора 2 % и 0,1 мл уксусной кислоты,доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б испытуемый раствор).

Оптическую плотность раствора Биспытуемого растворазмеряют через 40 мин на спектрофотометре при длине волны 408нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из1 мл раствора А испытуемого раствора, 0,1 мл уксусной кислоты, доведенный спиртом 96 %до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО рутина в таких же условиях. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1,0 мл растворАСО рутина, 0,1 мл уксусной кислоты раствора, доведенный спиртом 96 %до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете нарутини абсолютно сухое сырье в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 25 \cdot a_0 \cdot 1 \cdot P \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 1 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot a_0 \cdot P \cdot 50}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где *A*– оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
A_o– оптическая плотность раствора Б СО рутина;
a–навескасырья,г;
a_o–навескаСОрутина,г;
P – содержание основного вещества в СО рутина, %;
W–влажность сырья,%.

Допускается содержание суммы флавоноидов в пересчете нарутин вычислять с использованием удельного показателя поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридомпо формуле:

$$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 250000}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где*A*– оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при длине волны 408 нм, равный 248;
a – навеска сырья, г;

W– влажность сырья, %.

Экстрактивные вещества.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1, экстрагенты– вода очищенная, спирт 70%).

Примечание.Определение суммы флавоноидов и экстрактивных веществ, извлекаемых водой, проводят для сырья, предназначенного для производства лекарственных растительных препаратов (пачки, фильтр-пакеты); определение суммы флавоноидов и экстрактивных веществ, извлекаемыхспиртом 70 % проводят для сырья, предназначенного для производстванастойки.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Калины обыкновеннойкора **ФС.2.5.0017.15**

Viburni opuli cortex

Собранная весной в фазу бутонизации кора стволов и ветвей дикорастущего и культивируемого кустарника или небольшого дерева калины обыкновенной –*Viburnum opulus* L., сем.жимолостных – *Caprifoliaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

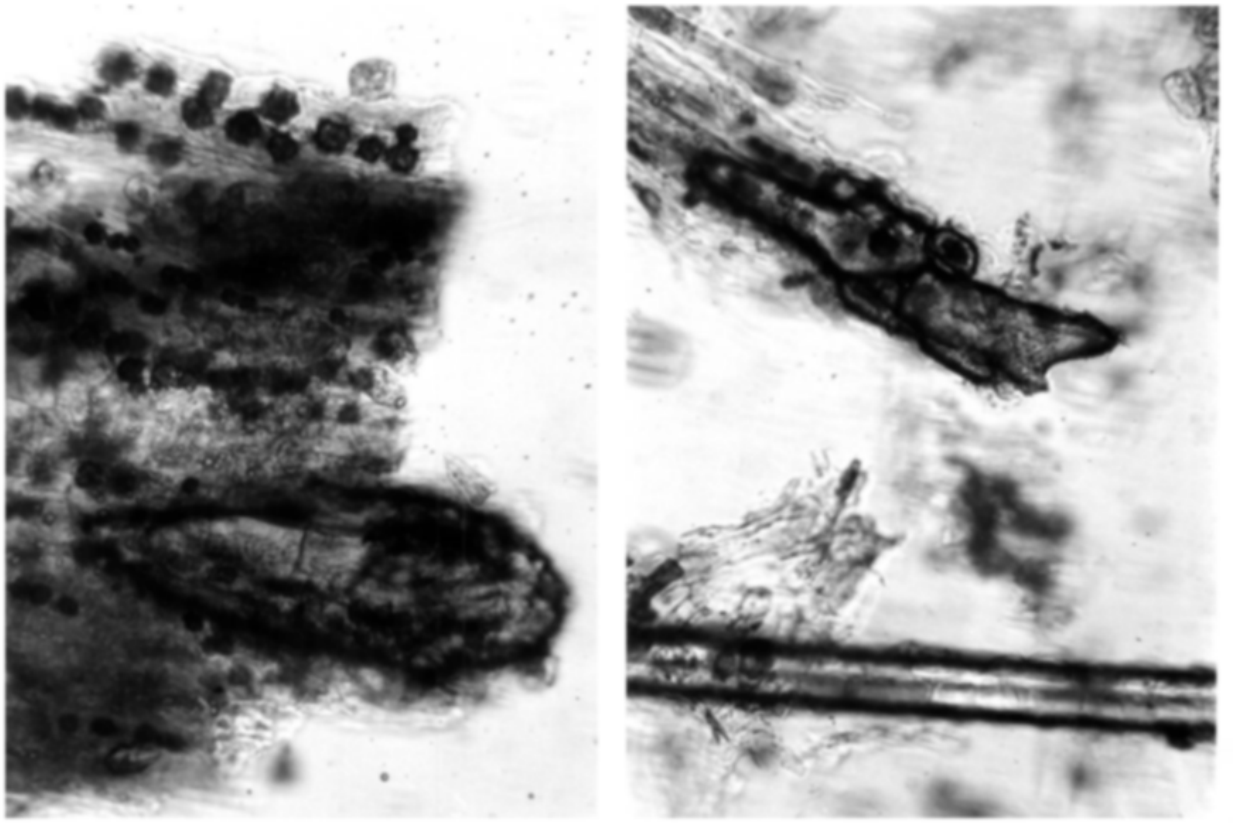
Внешние признаки. *Цельное сырье.* Трубчатые, желобоватые или плоские кусочки коры различной длины, толщиной около 2 мм. Наружная поверхность коры морщинистая, коричневато-серая или зеленовато-серая с мелкими чечевичками. Внутренняя поверхность гладкая, светло- или коричневато-желтая с мелкими красноватыми пятнышками или полосками. Излом коры мелкозернистый. Запах отсутствует или запах слабый. Вкус водного извлечения горьковатый, вяжущий.

Измельченное сырье. При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки коры различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.Кусочки коры, снаружи морщинистые коричневато-серого или зеленовато-серого цвета, с мелкими чечевичками; с внутренней стороны кусочки гладкие, светло- или коричневато-желтого цвета с мелкими красноватыми пятнышками или полосками. Излом – мелкозернистый. Запах отсутствуетили запах слабый. Вкус водного извлечения горьковатый вяжущий.

Микроскопические признаки.*Цельное сырье.* На поперечном срезе должен быть виден коричневый многорядный пробковый слой (более 100

рядов) с клетками неправильной формы (округлой, прямоугольной, квадратной в очертании) с прямыми и слабоизвилистыми стенками. Под пробкой располагается 3 – 4 ряда пластинчатой колленхимы. На границе первичной и вторичной коры одиночно или небольшими группами (по 2 – 4) расположены лубяные волокна. Стенки лубяных волокон толстые, слоистые, неодревесневшие, пронизаны тончайшими порами. Во вторичной коре редко расположены одно-трехрядные сердцевинные лучи; встречаются крупные каменистые клетки желтого цвета с сильно утолщенными слоистыми стенками, пронизанными многочисленными порами. Каменистые клетки представлены небольшими (2 – 6) тангентально-вытянутыми группами, реже встречаются одиночно. В паренхиме коры, особенно первичной, видны многочисленные крупные и мелкие друзы оксалата кальция и капли смолы.

*Измельченное сырье.*При рассмотрении«давленого»препарата должны быть видны мелкие и крупные частицы (обычно в продольном сечении): фрагменты бурой пробковой ткани; группы лубяных волокон с толстыми, слоистыми, неодревесневшими, пронизанными тончайшими порами стенками среди паренхимных клеток; фрагменты паренхимы с клетками, содержащими друзы оксалата кальция и капельки смолы; фрагменты паренхимы с каменистыми клетками желтого цвета с сильно утолщенными слоистыми стенками; отдельные группы каменистых клеток; одиночные друзы оксалата кальция.



Рисунок– Калины обыкновеннойкора.

1 – «давленый»микропрепарат с друзами оксалата кальция (125×); 2 – «давленый»микропрепарат с группами каменистых клеток, друзами оксалата кальция и лубяными волокнами(100×).

Определение основных групп биологически активных веществ

1. ***Тонкослойная хроматография***

Около 0,5 гсырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм,заливают 10 мл спирта 96 % и настаивают в течение 20 мин при комнатной температуре. Полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр в круглодонную колбу и выпаривают под вакуумом досуха, сухой остаток растворяют в 1млспирта 96 % (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 100 мкл испытуемого раствора.

Пластинку с нанесенной пробой сушат на воздухе, помещают в камеру со смесью растворителей хлороформ – метанол (9:1) и

хроматографируютвосходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей в вытяжном шкафу. Пластинку обрабатывают реактивом Шталя и выдерживают в сушильном шкафу при температуре 105-110 °С в течение 5 – 8 мин.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться 3 – 5 зон адсорбции сине-зеленого цвета (иридоиды) и 2 – 3 зоны адсорбции красно-малинового цвета(дубильные вещества); допускается обнаружение других зон адсорбции.

2. ***Качественные реакции***

При смачивании внутренней поверхности коры каплей железа(III) аммония сульфатараствора должно наблюдаться черно-зеленое окрашивание (дубильные вещества).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье,измельченное сырье*– не более 14 %.

Зола общая. *Цельное сырье,измельченное сырье*– не более 10 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте.*Цельное сырье, измельченное сырье*– не более 1 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье:*частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, –не более

5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Кусочки коры, потемневшие с внутренней стороны.*Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 5 %.

Кусочки коры с остатками древесины и веточек.*Цельное сырье,измельченное сырье* – не более 2 %.

Органическая примесь.*Цельное сырье,измельченное сырье* – не более

1,5 %.

Минеральная примесь.*Цельное сырье, измельченное сырье*– не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение.*Цельное сырье, измельченное сырье:*дубильных веществ в пересчете на танин – не менее 4 %; экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом50 %, – не менее 18 %.

Дубильные вещества.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1).

Экстрактивные вещества.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1, экстрагент – спирт 50 %).

Примечание. Определение дубильных веществ в пересчете на танин проводят для сырья, предназначенного для производства лекарственных растительных препаратов (пачки); экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 50 %, для сырья, предназначенного для производства экстрактов.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование

лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Калины плоды свежие	**ФС.2.5.0076.18**
Viburni fructus recens	**Взамен ВФС 42-3471-99**

Собранные в период полного созревания свежие плоды дикорастущих и культивируемых кустарников или небольших деревьев калины обыкновенной – *Viburnum opulus* L. и калины Саржента – *Viburnum sargentii Koehne*, сем. жимолостных – *Caprifoliaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Свежие, округлые, блестящие плоды - костянки диаметром 5 - 12 мм, с малозаметным остатком столбика и чашелистиков и углублением на месте отрыва плодоножки. В мякоти плода находится одна трудно отделимая плоская косточка сердцевидной формы.

Цвет плодов от оранжево-красного до темно-красного, косточек – светло-коричневый. Запах специфический. Вкус горьковато-кислый.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении эпидермиса плода с поверхности должны быть видны его клетки, в очертании многоугольные с четковидно-утолщенными, одревесневшими оболочками и обильным красно-оранжевым содержимым. Клетки эпидермиса толстостенные, степень толщины оболочек клеток, как и размеры самих клеток, варьируют.

Изредка должны встречаться устьица, окруженные кольцом нескольких (от 7 до 9) околоустьичных клеток, которые значительно меньше остальных клеток эпидермиса. Мякоть мезокарпа плода должна состоять из очень крупных тонкостенных клеток почти округлой формы с большими межклет-

никами. Должны встречаться проводящие пучки и друзы оксалата кальция. В нижней части плода, у места прикрепления к плодоножке, вокруг проводящих пучков должны быть видны многочисленные округлые каменистые клетки.

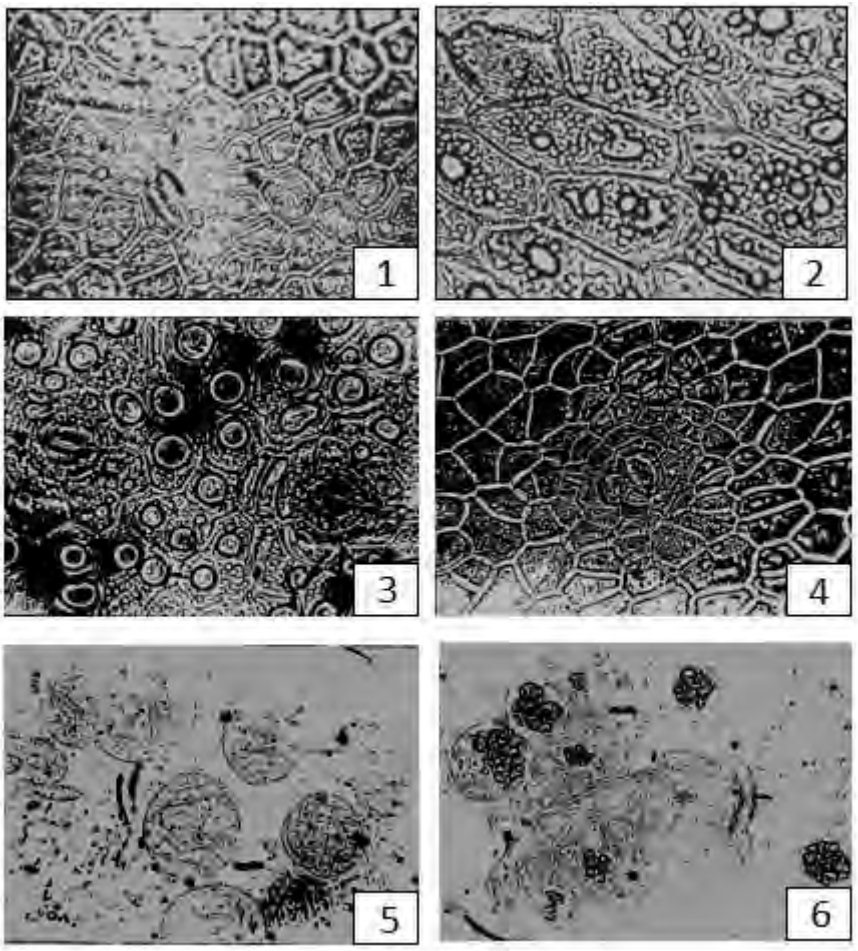


Рисунок – Калины плоды:
1 – клетки эпидермиса с неравномерной утолщенностью стенок (200×); 2 – клетки эпидермиса с четковидным утолщением и обильным оранжево-красным содержимым (400×); 3 – устьица аномоцитного типа (200×); 4 – эпидермис с устьицем и неравномерно утолщенными стенками (200×); 5 – крупные клетки мякоти мезокарпа (400×); 6 – друзы оксалата кальция (400×).

Определение основных групп биологически активных веществ

УФ-спектрофотометрия. 1 мл профильтрованного сока помещают в мерную колбу вместимостью 200 мл, доводят объем раствора 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты до метки и перемешивают. Регистрируют

УФ-спектр полученного раствора с помощью спектрофотометра в интервале длин волн от 240 нм до 360 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты.

УФ-спектр полученного раствора должен иметь максимум при (280 ± 3) нм.

Качественная реакция

Из 20 г свежих плодов отжимают сок. К 1 мл сока, прибавляют 2 мл воды и 1 мл раствора натрия гидроксида 20 %; должно наблюдаться окрашивание зеленого цвета (фенольные соединения).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье* – не менее 79 % и не более 89 % в соответствии с требованиями ОФС «Определение влажности в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Зола общая. *Цельное сырье* – не более 6 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье* – не более 1 %.

Посторонние примеси

Плодов недозрелых. *Цельное сырье* – не более 5 %.

Плодов изменивших окраску (потемневших). *Цельное сырье* – не более 3 %.

Плоды, поврежденные вредителями. *Цельное сырье* – не более 3 %.

Других частей калины *(плодоножек, в том числе отделенных при анализе, веточек, косточек, листьев).* ***Цельное сырье*** – не более 6 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье* – не более 0,5 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье* – не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение

содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье:* органических кислот в пересчете на яблочную кислоту – не менее 6 %.

Около 75 г калины плодов свежих целых измельчают в ступке, не нарушая целостности косточек. Около 15 г (точная навеска) измельченной массы плодов свежих помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл воды, колбу присоединяют к обратному холодильнику и кипятят на электрической плитке в течение 15 мин. Извлечение фильтруют через 4 слоя марли в мерную колбу вместимостью 250 мл. Оставшееся в колбе и на марле сырье промывают водой дважды порциями по 50 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

50 мл полученного раствора титруют 0,1 М раствором натрия гидроксида с потенциометрической индикацией точки титрования.

Содержание суммы органических кислот в пересчете на яблочную кислоту в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{V \cdot 0{,}0067 \cdot 250 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot 50 \cdot (100 - W)}$$

где V – объем 0,1 М раствора натрия гидроксида, пошедшего на титрование, мл;
0,0067 – количество яблочной кислоты, соответствующее 1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида, г;
a – навеска сырья, г;
W – влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственно-

го растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Кориандра посевного плоды **ФС.2.5.0018.15**

Coriandri sativi fructus

Собранныезрелыеи высушенныеплодыкультивируемогооднолетнеготравянистогорастениякориандрапосевного–*Coriandrum sativum* L.,сем.сельдерейных–*Apiaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки.*Цельноесырье.*Плоды(вислоплодники) размером 1,5– 6 ммшарообразнойформы,отдельныеполуплодики,отжелтовато-серогодокоричневато-серогоилиотсоломенно-желтогодожелтовато-коричневогоцвета.Наповерхностиоколоплодникацельногоплодавидны10продольныхизвилистыхребрышек,чередующихсяс12прямыми,наверхушкеплода–остаткичашечкииистолбика.Навнутреннейсторонекаждогополуплодикавидныдва крупных удлиненно-овальных эфирномасличныхканала желтовато-коричневого или коричневогоцвета. Запах сильный, характерный.Вкус водного извлечения пряный.

Микроскопические признаки.*Цельноесырье.*На поперечном срезе плода должны быть видны: эпидермис околоплодника (экзокарпий), состоящий из двух слоев овальных клеток; тангентально вытянутые клетки мезокарпия; механический пояс, состоящий из волокнистых склереид с сильноутолщеннымилигнифицированными оболочками, расположенных пластами, которые видны как в поперечном, так и в продольном сечении; примыкающиек механическому поясу тангентально вытянутые клетки с сетчатым и пористым утолщением; эндокарпий околоплодника, плотно сросшийся с семенной кожурой, заметен в виде темной полосы;

семя,имеющее форму полумесяца; на плоской стороне мерикарпиев– крупные эфирномасличные канальцы, по два у каждого полуплодика; эндосперм семени, состоящий из крупных многоугольных толстостенных клеток, заполненных алейроновыми зернами, каплями жирного масла и мелкими друзами оксалата кальция.

При рассмотрении под микроскопом «давленого»микропрепарата плода должны быть видны фрагменты эпидермиса экзокарпия с устьицами; фрагменты механического слоя мезокарпия, волнистые толстостенные волокна которого расположены в продольном и поперечном направлениях; фрагменты эндокарпия, группы узких длинных тонкостенных клеток которого расположены в косо-продольном и продольном направлениях, часто с остатками паренхимы мезокарпия, представленной толстостенными пористыми клетками; фрагменты семени, включающие тонкостенные коричневатые клетки семенной кожуры и группы крупных многоугольных толстостенных клеток эндосперма, заполненных алейроновыми зернами, каплями жирного масла и мелкими друзами оксалата кальция; цельный зародыш с округлыми листочками или его фрагменты.

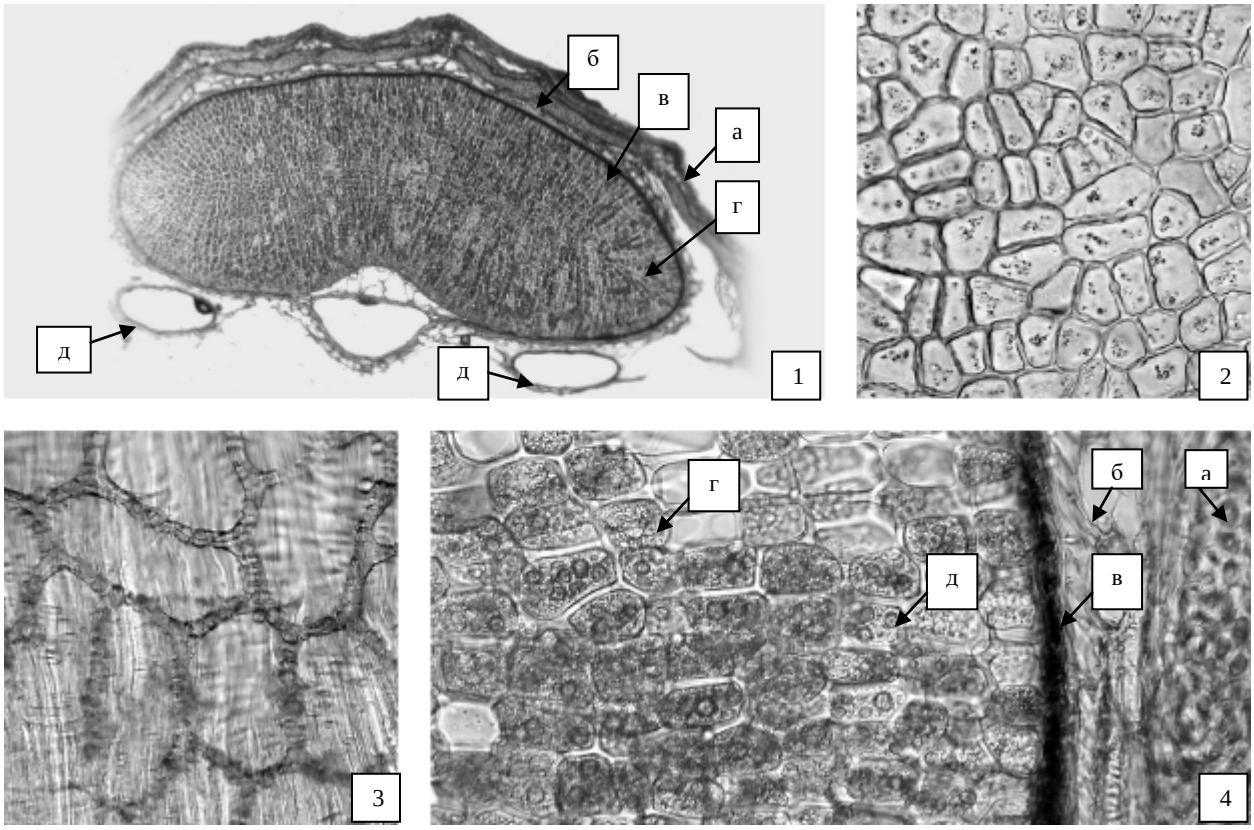


Рисунок –Кориандраплоды.

1–поперечныйсрезполуплодика:а–экзокарпий,б–механическийслоймезокарпия,в–эндокарпий,г–эндоспермсемени,д–эфирномасличные канальцы (40×);2–клетки эпидермиса (200×);3–фрагментэндокарпия (200×);4–фрагментпоперечногосрезаполуплодика:а–механическийслоймезокарпия,б–тангентальновытянутыеклеткиссетчатымипористымутолщением,в–эндокарпий,г–эндоспермсеменискаплямасла, д–эндоспермсеменисдрузамиоксалатакальция (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Растворстандартного образца (СО)суданаIII.Около0,002 г СО судана IIIрастворяютв10 млтолуолаиперемешивают. Срок годности раствора неболее3 мес при хранении впрохладном,защищенномотсветаместе.

Около1,0 г сырья измельчают до отсутствия цельных плодов, сразу помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл смеси толуол– спирт 96 % (1:4) и выдерживают на ультразвуковой бане в течение 10 мин.Полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр,

содержащий 2 г натрия сульфата безводного (испытуемый раствор).

На линию старта высокоэффективной хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 10 мкл испытуемого раствора и 5 мкл раствора СО судана III.

Пластинкуснанесеннымипробамисушатприкомнатнойтемпературе,помещаютвкамеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин смесью растворителей толуол– этилацетат (95:5) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80–90 %длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей. Пластинку обрабатывают анисового альдегида раствором уксуснокислым в этаноле, выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100– 105 °С в течение 2– 3 мин и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО судана III должна обнаруживаться зона адсорбции фиолетового, красно-фиолетового, фиолетово-голубого или голубого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться зона адсорбции фиолетового или фиолетово-коричневого цвета ниже зоны адсорбции СО судана III и зона адсорбции фиолетового или серо-фиолетового цветавыше зоны адсорбции судана III; допускается обнаружение дополнительных зонадсорбции (терпеноиды).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность.*Цельноесырье*–не более 13 %.

Золаобщая.*Цельноесырье*–не более 7 %.

Зола,нерастворимаявхлористоводороднойкислоте.*Цельноесырье*–не более 1,5 %.

Посторонние примеси

Поврежденные, недоразвитыеплодыкориандраидругиечастирастения.*Цельноесырье*–

неболее3%.

Органическаяпримесь. *Цельное сырье* – неболее2%.

Минеральнаяпримесь.*Цельное сырье*– не более 1 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественноеопределение.*Цельноесырье*: эфирногомасла– неменее0,5 %.

Определение эфирного маслапроводят всоответствииистребованиямиОФС«Определениесодержанияэфирногомаслав лекарственномрастительномсырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 2, из 20,0 г сырья, измельченного до отсутствияцельныхплодов,времяперегонки1ч).

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Крапивы двудомной листья **ФС.2.5.0019.15**

Urticae dioicae folia

Собранные во время бутонизации и цветения, высушенные листья дикорастущего и культивируемого многолетнего травянистого растения крапивы двудомной – *Urtica dioica* L., сем.крапивных – *Urticaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки.*Цельное сырье.* Листья цельные или частично измельченные, простые, черешковые, длиной до 20 см, шириной до 9 см, яйцевидно-ланцетовидные и широкояйцевидные с острой верхушкой и сердцевидным основанием; край остро- и крупнопильчатый с изогнутыми к верхушке зубцами. При рассматривании сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видно, что листовая пластинка с двух сторон опушена короткими одноклеточными волосками с острой верхушкой (ретортовидными), поэтому на ощупь она шершавая. Кроме того, с нижней стороны и по жилкам встречаются волоски с многоклеточным основанием и длинной конечной клеткой (жгучие). Цистолиты – беловатые округлые и эллиптические образования на темно-зелёном фоне.

Черешки листьев длиной до 8 см, округлые или полукруглые в сечении с бороздкой на верхней стороне, опушены густо жесткими ретортовидными волосками и реже–жгучими волосками или их основаниями.

Плод – орешек яйцевидной или эллиптической формы, в разной степени зрелости от зелёного, желтовато-зелёного до светлокоричневого цвета.

Цвет листьев с верхней стороны от зеленого до темно-зеленого, с

нижней светлее – серовато-зеленый или зеленый; черешков – зеленый, желтовато-зелёный или серовато-зеленый. Запах слабый.Вкус водного извлечения горьковатый.

Измельченное сырье. Смесь кусочков листовых пластинок, черешков, редко – цветоносов, стеблей, отдельных цветков и семян, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки листовых пластинок от зеленого до темно-зелёного цвета с беловатыми округлыми и эллиптическими цистолитами, с мелкими торчащими ретортовидными волосками, с обломанными, редко цельными жгучими волосками или их чашевидными основаниями и вытянутыми ретортовидными волосками, особенно многочисленными по жилкам.

Видны кусочки черешков округлых или полукруглых в сечении, с бороздкой, густо опушенных ретортовидными волосками и реже встречающимися жгучими волосками или их основаниями. Редко встречаются овальные с заостренной верхушкой семена размером около 1 мм от светло-зеленого до светло-коричневого цвета, цветки или их части – мелкие, однополые с простым четырёхраздельным зелёным околоцветником, густоопушенные кусочки цветоносов, кусочки продольно-расщепленных стеблей с белой или желтовато-белой сердцевиной и наружной поверхностью зеленого, желтовато- или зеленовато-коричневатого цвета и плоды – орешки мелкие эллиптические или яйцевидные зеленовато-жёлтые.

Цвет измельченного сырья от зеленого до темно-зеленого с серо-зелеными, белыми, желто-белыми и коричневыми вкраплениями. Запах слабый. Вкус водного извлечения горьковатый.

Порошок. Смесь кусочков листовых пластинок, черешков, редко – цветоносов, стеблей, отдельных цветков (или их частей) и семян, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны: кусочки листовой пластинки с короткими ретортовидными волосками

и остатками длинных ретортовидных и жгучих волосков, кусочки черешков и крупных жилок листа с волосками и их остатками; редко встречаются: овальные с заостренной верхушкой семена размером около 1 мм, мелкие (около 2 мм в диаметре) цельные светло-зеленые цветки или их части, листочки околоцветника, густоопушенные кусочки цветоносов, кусочки продольно-расщепленных стеблей, плоды-орешки яйцевидной или эллиптической формы.

Цвет порошка от серовато-зеленого до темно-зеленого, с беловатыми, коричневатыми, желтоватыми вкраплениями. Запах слабый.Вкус водного извлечения горьковатый.

Примечание.К недопустимым примесям относят:

а) Крапива жгучая (*Urticaurens*L.) – однолетнее, усаженное жгучими волосками растение с прямым или при основании восходящим 4-гранным стеблем. Листья супротивные, на длинных почти равных или немного короче пластинки черешках. Яйцевидные или эллиптические, коротко заостренные, при основании широко-клиновидные, реже закругленные, по краям крупно-остро-пильчатые, 2 – 5 см длиной и 1,5 – 3,5 см шириной. Прилистники ланцетовидные маленькие. Цветки однодомные. Те и другие собраны вместе прерывистыми ветвистыми колосьями, выходящими из пазух листьев.

б) Крапива коноплевая (*Urticacannabina*L.) – многолетнее травянистое растение высотой 70 – 120см, стебли ребристые прямостоячие, обыкновенно неветвистые, 4-гранные, усаженные жгучими и мелкими простыми волосками. Листья 7–5 см длиной и 6–12 см шириной, глубоко 3–5-рассеченные с перистозубчатыми надрезами. Цветки одно- или двудомные.

в) Яснотка белая (*Lamiumalbum*., сем. Яснотковые–Lamiaceae) – стебли 20–100 см высотой, прямые, простые или ветвистые, в основном одиночные, покрытые одиночными вниз отклоненными волосками. Листья 2–10 см длиной, яйцевидные, при основании неглубоко-сердцевидные, верхние длиннозаостренные, по краю пиловиднозубчатые, рассеяно-волосистые, на черешках. Цветки в мутовках, расположены в пазухах листьев. Прицветники линейные, в 3–6 раз короче чашечек. Чашечки редко волосистые, зубцы их длиннее трубок, тонко и длинно заостренные. Венчики 2–2,5 см длиной, желтоватые, грязно-белые, изредка беловато-розовые; верхняя губа снаружи волосистая.

Микроскопические признаки.*Цельное сырье.*При рассмотрении листа с поверхности должны быть видно, что клетки верхнего эпидермиса – многоугольные с прямыми или слабоизвилистыми стенками, нижнего – с

сильноизвилистыми. Устьица расположены в основном на нижней стороне листа и окружены 3–5 клетками эпидермиса (аномоцитный тип). В некоторых клетках эпидермиса имеются продолговато-округлые с зернистой структурой и небольшим пятном в центре – просвечивающейся ножкой– кристаллические включения (цистолиты). Волоски с обеих сторон листа 3 типов: жгучие, ретортовидные и головчатые. Жгучие волоски представляют собой клетку, с одной стороны вытянутую в полый тонкий длинный конец в виде иглы с верхушкой, оканчивающейся легко обламывающейся головкой, а с другой стороны расширенную в продолговатую эллиптическую полость (капсулу), погружённую в многоклеточное основание – подставку из эпидермальных клеток. Ретортовидные волоски – одноклеточные, с округлым расширенным основанием, слегка погружённым в эпидермис, и с вытянутой заостренной верхушкой. Головчатые волоски – мелкие с двух-, реже трехклеточной шаровидной головкой на одноклеточной ножке.

Сосуды крупных жилок и черешка («давленый» препарат) сопровождаются мелкими друзами, образующими характерные цепочки.

Измельченное сырье. При рассмотрении кусочков листьев с поверхности должны быть видны многоугольные клетки эпидермиса с прямыми, слабоизвилистыми или с сильноизвилистыми стенками. Устьица аномоцитного типа расположены, в основном, на одной стороне листовой пластинки. В некоторых клетках эпидермиса имеются продолговато-округлые с зернистой структурой и небольшим пятном в центре – просвечивающейся ножкой -цистолиты. Волоски или их обломки с обеих сторон листа 3 типов: ретортовидные, жгучие, головчатые.

Сосуды крупных жилок и черешка («давленый» препарат) сопровождаются мелкими друзами, образующими характерные цепочки.

Порошок. При рассмотрении микропрепаратов порошка под микроскопом должны быть видны: фрагменты листа с эпидермисом из клеток с извилистыми или прямыми стенками; устьицааномоцитного типа; часто встречаются цистолиты в виде продолговатых, округлых и

неправильной формы образований зернистой структуры, в центре которых, как правило, хорошо заметно основание ножки в виде кружочка; встречаются волоски 3 типов–ретортовидные, жгучие и головчатые;ретортовидные волоски одноклеточные, с расширенным основанием, встречаются как в виде обломков, так и неповрежденные; жгучие волоски, состоящие из многоклеточного основания и погруженной в него крупной конечной клетки с легко обламывающейся головкой, чаще встречаются обломанными; реже встречаются мелкие головчатые волоски с двух- или трехклеточной головкой на одноклеточной ножке.

Иногда встречаются фрагменты тканей черешков и крупных жилок с цепочками мелких друз оксалата кальция вдоль сосудов, имеющих спиральные вторичные утолщения стенок.

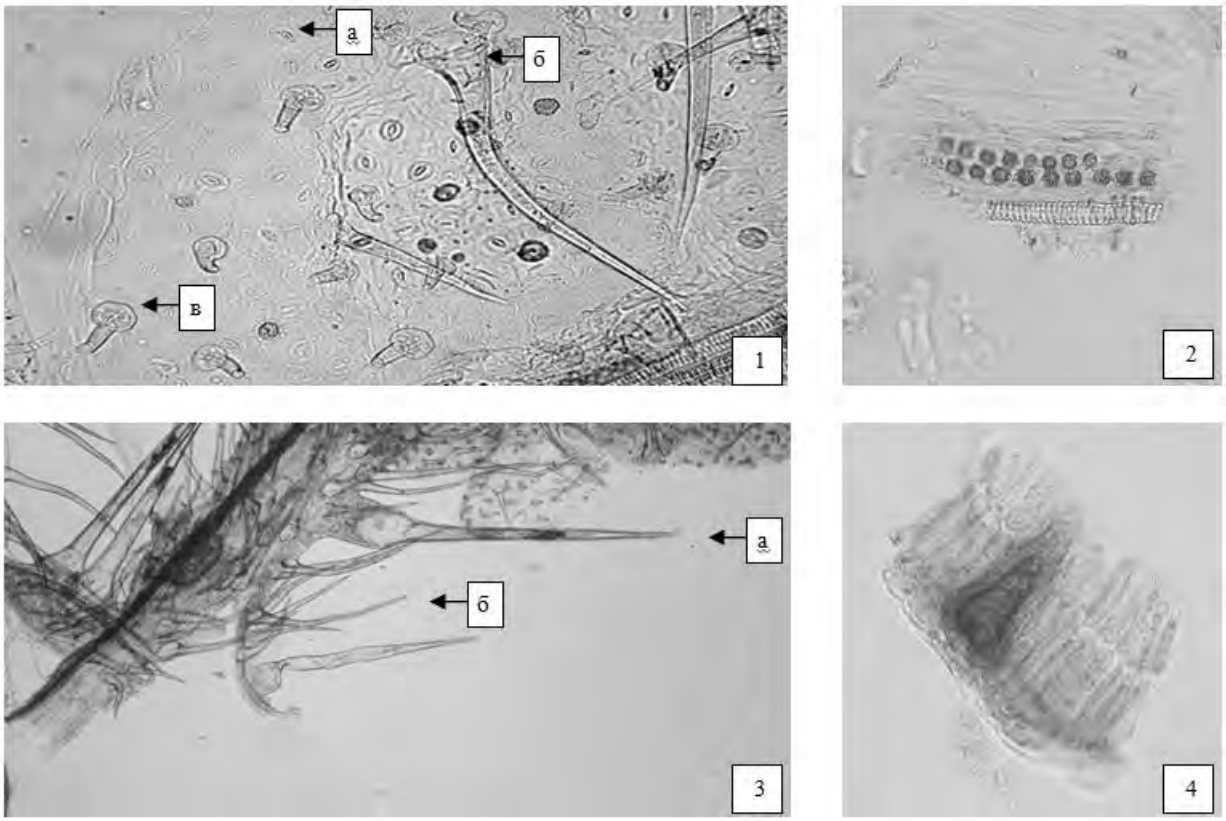


Рисунок – Крапивы двудомной листья.

1 – фрагмент эпидермиса: а– устьицааномоцитноготипа,б – ретортовидный волосок, в – головчатый волосок (200×), 2 – фрагмент жилки с друзами оксалата кальция (200×), 3 – фрагмент эпидермиса: а – жгучий волосок, б –

ретортовидные волоски (40×), 4 – фрагмент листовой пластинки в поперечном сечении с цистолитом (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

*Раствор стандартного образца (СО) хлорогеновой кислоты.*Около 0,02 г СО хлорогеновой кислоты растворяют в 25 мл спирта 96 % и перемешивают.Срок годности раствора 3 мес при хранении в хорошо укупоренной упаковке, в прохладном защищенном от света месте.

*Раствор СО витамина $К_1$.*Около 0,02 гСО витамина $К_1$растворяют в 25 мл гексана и перемешивают. Срок годности раствора 30 сут при хранении в хорошо укупоренной упаковке, в прохладном защищенном от света месте.

1. Около 1,0 гсырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,2 мм, помещают в плоскодонную коническую колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 10 мл спирта 96 % и нагревают с обратным холодильником на водяной бане в течение 15 мин. Затем содержимое колбы охлаждают и фильтруют через бумажный фильтр. Полученный фильтрат высушивают под вакуумом при температуре 40°С досуха. К сухому остатку прибавляют 2 мл спирта 96 % (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 10 мкл испытуемого раствора и 5 мкл раствора СО хлорогеновой кислоты.Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе в течение5–10 мин, помещают в камеру,предварительно насыщенную в течение 30 мин смесью растворителей муравьиная кислотабезводная – метанол–этилацетат (2,5:4:50), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителя пройдетоколо 80–90% длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, нагревают в сушильном шкафу при 100–105 ºС в течение 3–5 мин, обрабатывают дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира раствором 1 % в спирте 96 %, и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО хлорогеновой кислоты должна

обнаруживаться зона адсорбции с интенсивной сине-голубой флуоресценцией.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться зона адсорбции с интенсивной сине-голубой флуоресценцией на уровне зоны на хроматограмме растворов СО хлорогеновой кислоты и зона адсорбции с интенсивной синей флуоресценцией выше зоны хлорогеновой кислоты; допускается обнаружение других зон адсорбции (фенольные соединения).

2. Около 1,0 гсырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,25 мм, помещают в плоскодонную коническую колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 10 мл гексана и перемешивают на механическом встряхивателе в течение 3 ч. Затем фильтруют через бумажный фильтр, отгоняют растворитель на ротационном испарителе при температуре водяной бани не выше 45°С до объема 2–3 мл (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 100 мкл испытуемого раствора и 10 мкл раствораСОвитамина $К_1$.Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе при комнатной температуре в течение 5 – 10 мин, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин верхним слоемсмеси растворителей гексан–хлороформ (8:3), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80–90% длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм в течение не менее 2 мин.

На хроматограмме раствора СОвитамина $К_1$ должна обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией желто-зеленого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживатьсяосновная зона адсорбции с флуоресценцией желто-зеленого цвета на уровне зоны адсорбции витамина $К_1$; допускается обнаружение других зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность.*Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* – не более 14 %.

Зола общая.*Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* – не более 20 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье,измельченное сырье, порошок* – не более 2 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм,– не более 5 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, –не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм,– не более 5 %. *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, –не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, –не более 5 %.

Посторонние примеси

Сырье, изменившее окраску (потемневшее и почерневшее).*Цельное сырье,измельченное сырье* – не более 5 %.

Другие части растения (стебли, соцветия и пр.).*Цельное сырье,измельченное сырье* – не более 5 %.

Органическая примесь.*Цельное сырье,измельченное сырье* – не более 2 %.

Минеральная примесь.*Цельное сырье, измельченное сырье,порошок*– не более 1 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок:* сумма оксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту – не менее 0,3 %.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих через сито с отверстиями размером 1 мм. Около 0,5 г(точная навеска) измельченного сырья помещают в круглодонную колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл спирта 70 %. Колбу с содержимым присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане в течение 30 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. После охлаждения извлечение фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью100 мл. Экстрагирование повторяют еще раз в описанных выше условиях. Полученное извлечение фильтруют в ту же мерную колбу. Объединенные извлечения в мерной колбе доводят спиртом 70 %до метки и перемешивают (раствор А).

2,0 мл раствора А переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б). Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре при длине волны 330 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют спирт 96 %.

Содержание суммы оксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту в абсолютно сухом сырье в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100 \cdot}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 2 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 125000}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где *A* – оптическая плотность раствора Б;

$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения хлорогеновой кислоты при длине волны 330 нм, равный 507;
a – навеска сырья, г;
W – влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Красавки листья	**ФС.2.5.0077.18**
Belladonnae folia	**Взамен ГФ XI, вып. 2, ст. 13**

Собранные в фазу начала бутонизации до массового плодоношения и высушенные листья многолетнего культивируемого травянистого растения красавки белладонны - *Atropa bella-donna* L.s.l., сем. пасленовых – *Solanaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Цельные или частично измельченные листья эллиптической, яйцевидной или продолговато-яйцевидной формы, к верхушке заостренные, цельнокрайние, к основанию суживающиеся в короткий черешок, тонкие, длиной до 20 см и шириной до 10 см.

Цвет листьев сверху зеленый или коричневато-зеленый, снизу более светлый. Запах слабый, характерный. Вкус водного извлечения не определяется (сырье ядовито).

Измельченное сырье. Кусочки листьев различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет зеленый или коричневато-зеленый. Запах слабый, характерный. Вкус водного извлечения не определяется (сырье ядовито).

Микроскопические признаки. *Цельное сырье. Измельченное сырье*.

При рассмотрении листа с поверхности должны быть видны клетки эпидермиса с извилистыми боковыми стенками и складчатой кутикулой. Устьица многочисленные, окружены 3 – 4 околоустьичными клетками, из которых одна значительно мельче других (анизоцитный тип), преобладают на нижней стороне листа. Волоски редкие, головчатые и простые. Головчатые

волоски двух типов: с длинной многоклеточной ножкой и одноклеточной головкой, с одноклеточной ножкой и многоклеточной (из 4 – 6 клеток) головкой. Простые волоски 2 – 3 (реже 6)–клеточные, с тонкими стенками. В губчатой паренхиме должны быть видны овальные клетки, заполненные мелким кристаллическим песком оксалата кальция. При малом увеличении они имеют вид темных, почти черных пятен, при большом – сероватые, с различимой кристаллической зернистостью. Очень редко в центре клетки с кристаллическим песком должны быть различимы друзы или призматические кристаллы оксалата кальция.

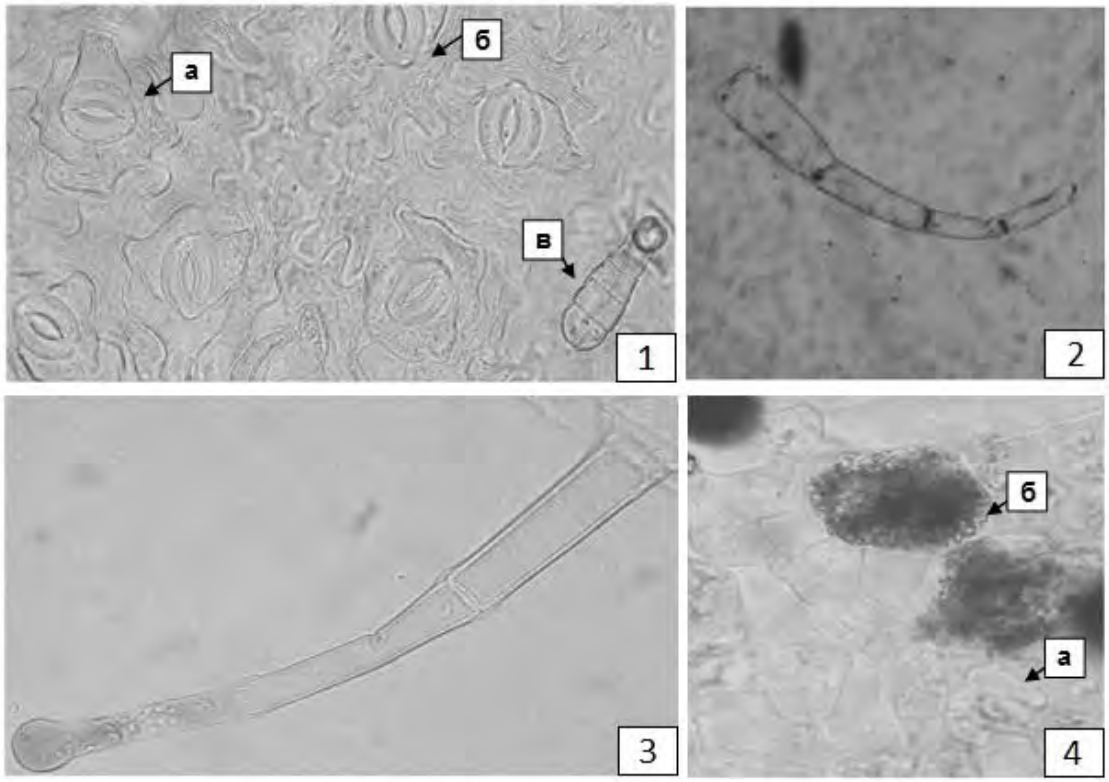


Рисунок – Красавки листья

1 – фрагмент эпидермиса листа: а – устьица анизоцитного типа, б – складчатость кутикулы, в – головчатый волосок (200×); 2 – простой волосок (40×), 3 – головчатый волосок (200×), 4 – губчатая паренхима листа: а – клетки паренхимы, б – клетки с кристаллическим песком (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 20 мкл (0,2 мл) раствора 2 (см. «Количественное определение»). Пластинку с нанесенной пробой сушат при комнатной температуре, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин системой растворителей ацетон – аммиака раствор 10 % (95 : 5), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и обрабатывают реактивом Драгендорфа.

На хроматограмме раствора 2 должна обнаруживаться доминирующая зона адсорбции оранжевого цвета (алкалоиды); допускается обнаружение других зон адсорбции.

Качественная реакция

1 г красавки белладонны листьев измельченных до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещают в коническую колбу вместимостью 50 мл, приливают 10 мл спирта 40 % и кипятят с обратным холодильником на водяной бане с температурой 80 - 85 °С в течение 1 ч.

5 мл полученного извлечения выпаривают на водяной бане до 1 мл, переносят с помощью 3 мл воды очищенной в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 0,5 мл аммиака раствора 10 %, 15 мл хлороформа и взбалтывают в течение 3 мин. Затем добавляют 2 г натрия сульфата безводного и снова взбалтывают в течение 3 мин. Хлороформное извлечение фильтруют через бумажный фильтр с 2 натрия сульфата безводного в фарфоровую чашку. Фильтр промывают 5 мл хлороформа. Хлороформ выпаривают на водяной бане, к остатку добавляют 1 мл азотной кислоты концентрированной и выпаривают на водяной бане досуха. Сухой остаток охлаждают и смачивают 1 мл ацетона и 4 каплями калия гидроксида 0,5 М раствора спиртового;

должно наблюдаться быстро исчезающее фиолетовое окрашивание (алкалоиды).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 13 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 15 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* измельченных частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, – не более 4 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; измельченных частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Листьев, изменивших окраску (пожелтевших, потемневших, почерневших). *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 4 %.

Других частей растения (стеблей, цветков, плодов)**.** *Цельное сырье* – не более 4 %.

Органической примеси. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 0,5 %.

Минеральной примеси. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Сумма алкалоидов в пересчете на гиосциамин.

Цельное сырье, измельченное сырье: суммы алкалоидов в пересчете на гиосциамин – не более 0,3 %.

Приготовление растворов.

0,02 М хлористоводородной кислоты. 20,0 мл 1 М раствора хлористоводородной кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 10 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 250 мл, приливают 150 мл эфира, 7 мл аммиака раствора 10 % и взбалтывают смесь в течение 1 ч. Эфирное извлечение быстро фильтруют через вату в колбу вместимостью 200 мл, прикрывая воронку часовым стеклом. К фильтрату приливают 5 мл воды, энергично взбалтывают и оставляют до просветления эфирного слоя, после чего отмеривают с помощью мерного цилиндра 90 мл эфирного извлечения в делительную воронку вместимостью 200 мл. Цилиндр дважды ополаскивают эфиром порциями по 10 мл, которые присоединяют к отмеренному эфирному извлечению (раствор 1).

Из эфирного извлечения алкалоиды максимально извлекают хлористоводородной кислотой 1 % порциями по 20, 15, 10 мл (проба с реактивом Майера), каждый раз фильтруя через смоченный водой бумажный фильтр диаметром 5 см во вторую делительную воронку такой же вместимости. Фильтр промывают дважды хлористоводородной кислотой 1 % по 5 мл, присоединяя промывную жидкость к общему кислотному извлечению.

Кислотное извлечение подщелачивают аммиака раствором 10 % до щелочной реакции по фенолфталеину и алкалоиды извлекают последовательно 20, 15, 10 мл хлороформа, взбалтывая по 3 мин. Хлороформные извлечения

фильтруют в колбу для отгонки вместимостью 100 мл через бумажный фильтр, на который предварительно помещают 4-5 г свежепрокаленного натрия сульфата безводного, смоченного хлороформом. Фильтр дважды промывают хлороформом по 5 мл (раствор 2). Хлороформ отгоняют на водяной бане до объема 1-2 мл, остаток хлороформа в колбе удаляют продуванием воздуха до полного исчезновения запаха растворителя. Сухой остаток растворяют в 15 мл 0,02 М хлористоводородной кислоты при подогревании на водяной бане, прибавляют 2 капли метилового красного спиртового раствора 0,1 % и 1 каплю метиленового синего спиртового раствора и избыток хлористоводородной кислоты титруют 0,02 М раствором натрия гидроксида до появления зеленой окраски.

Содержание суммы алкалоидов в пересчете на гиосциамин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(15 - V) \cdot 0{,}005780 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot (100 - W)}$$

где:

0,005780 - количество алкалоидов в пересчете на гиосциамин, соответствующее 1 мл 0,02 М хлористоводородной кислоты, в г;

V - объем 0,02 М раствора натрия гидроксида, израсходованного на титрование, в мл;

a - навеска сырья, соответствующая отмеренному объему эфирного извлечения, в г;

W – влажность сырья, в процентах.

Содержание суммы алкалоидов в пересчете на гиосциамин должно быть не более 0,3 %.

Примечание. В случае завышенного содержания суммы алкалоидов (в пересчете на гиосциамин в %) расчет количества лекарственного растительного сырья, необходимого для производства лекарственного препарата следует проводить по формуле, приведенной в ОФС «Лекарственное растительное сырье. Фармацевтические субстанции растительного происхождения».

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Красавки трава **ФС.2.5.0020.15**

Belladonnae herba

Собранная в период от бутонизации до массового плодоношения и высушенная трава культивируемых многолетних травянистых растений красавки обыкновенной – *Atropa belladonna* L. и красавки кавказской – *Atropa caucasica* Kreyer, сем.пасленовых – *Solanaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки.*Цельное сырье.* Смесь облиственных стеблей и их кусков, иногда с цветками и плодами различной степени развития, измельченных, реже цельных листьев, черешков, бутонов, цветков и плодов. Стебли цилиндрические или сплюснутые, слегка ребристые, с рыхлой белой сердцевиной или полые. Листья очередные или попарно сидячие, эллиптические, яйцевидные или продолговато-яйцевидные, к верхушке заостренные, к основанию суживающиеся в короткий черешок, цельнокрайние, с тонкими, ломкими пластинками, длиной до 20 см, шириной до 10 см, в сырье часто смятые и изломанные. Цветки одиночные или парные, сидячие на коротких железистоопушенных цветоносах. Венчик трубчато-колокольчатый, чашечка пятизубчатая. Плод – шаровидная ягода с остающейся чашечкой.Цвет стеблей от светло-зеленого до коричневато- или зеленовато-фиолетового, листьев – зеленый или коричневато-зеленый, снизу более светлый; цветков – коричневато-фиолетовый или желтый; плодов – в зависимости от степени зрелости –зеленый, коричневато-фиолетовый или черный. Запах слабый. Вкус водного извлечения не определяется (сырье ядовито).

Измельченное сырье. Кусочки стеблей, листьев, цветков и плодов, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки слегка ребристых стеблей с одной стороны – от светло-зеленого до коричневато- или зеленовато-фиолетового цвета, с другой стороны – белые; кусочки листовой пластинки с одной стороны – зеленого или буровато-зеленого цвета, с другой – более светлые; фрагменты цветков коричневато-фиолетового или желтого цвета, фрагменты чашечки зеленого цвета; фрагменты плодов – зеленого, коричневато-фиолетового или черного цвета.

Цвет измельченного сырья серовато-зеленый с фиолетовыми и желтыми вкраплениями. Запах слабый. Вкус водного извлечения не определяется (сырье ядовито).

Микроскопические признаки.*Цельное и измельченное сырье.* При рассмотрении листа с поверхности должны быть видны клетки эпидермиса с извилистыми боковыми стенками и складчатой кутикулой, которая хорошо заметна вокруг устьиц. Устьица многочисленные, окружены 3 – 4 околоустьичными клетками, из которых одна значительно мельче других (анизоцитный тип), преобладают на нижней стороне листовой пластинки. Встречаются головчатые и простые волоски. Головчатые волоски двух типов: с длинной многоклеточной ножкой и одноклеточной головкой, с одноклеточной ножкой и многоклеточной (из 4 – 6 клеток) головкой. Простые волоски 2–3-(реже 6)-клеточные, с тонкими стенками. В губчатой паренхиме видны овальные клетки, заполненные мелким кристаллическим песком оксалата кальция. При малом увеличении они имеют вид темных, почти черных пятен, при большом – сероватые с различимой кристаллической зернистостью. Очень редко в центре клетки с кристаллическим песком можно различить друзы или призматические кристаллы оксалата кальция, иногда встречаются отдельные друзы и призматические кристаллы оксалата кальция.

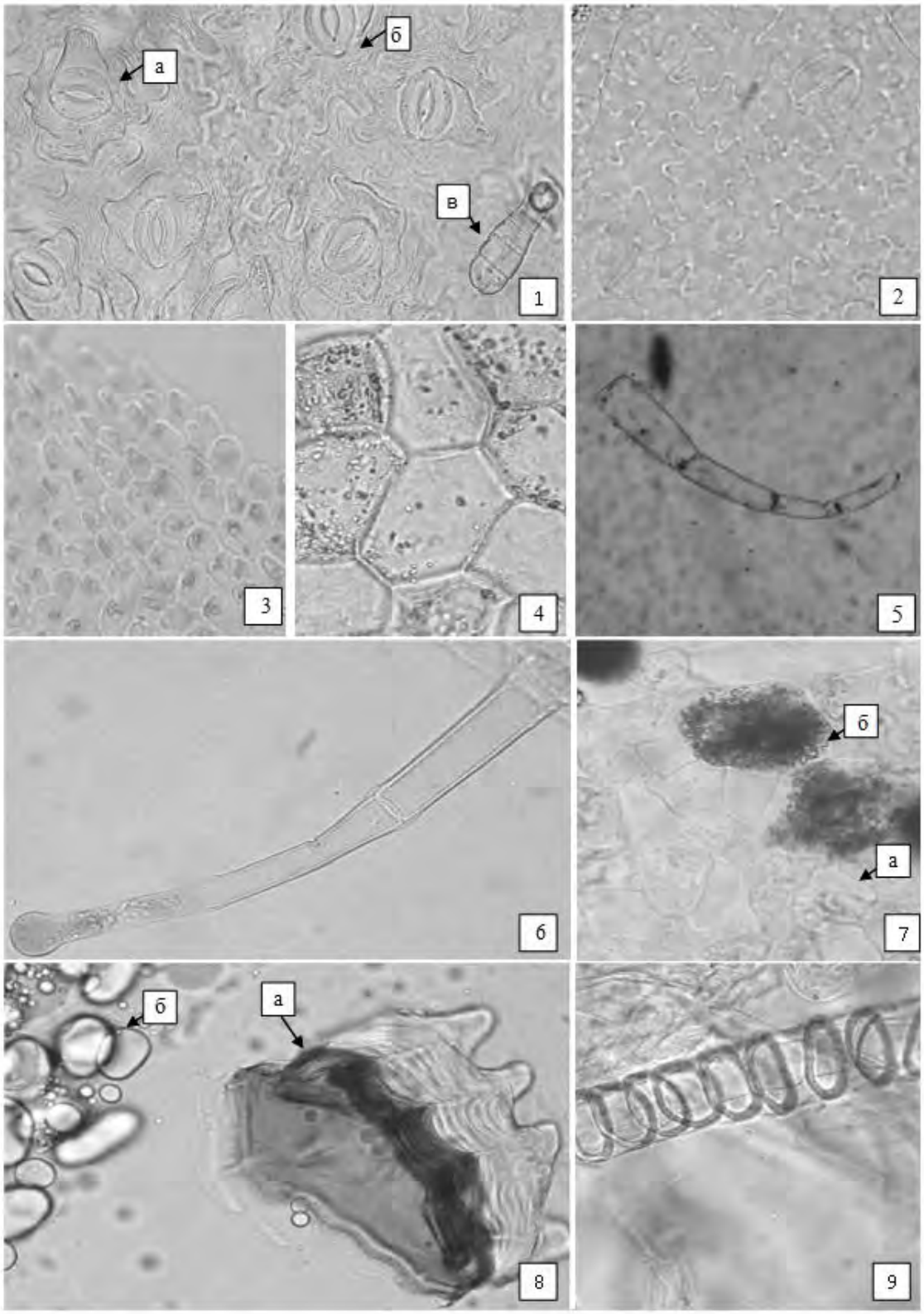
При рассмотрении с поверхности верхней части лепестков должны быть видны клетки эпидермиса с сосочковидными выростами и складчатой кутикулой. В средней и нижней части лепестка клетки эпидермиса с сильноизвилистыми боковыми стенками. Устьица анизоцитного типа, расположенные с наружной стороны. На поверхности лепестков имеются многочисленные простые многоклеточные волоски и головчатые волоски с длинной многоклеточной ножкой и одноклеточной головкой. Встречаются пыльцевые зерна с тремя порами.

На поверхности чашелистиков и цветоножек должны быть видны клетки эпидермиса с сильноизвилистыми боковыми стенками и складчатой кутикулой, устьица анизоцитного типа, имеются многочисленные простые и головчатые волоски, характерные для сырья красавки, и их фрагменты. В губчатой паренхиме встречаются цистолиты, отдельные друзы и призматические кристаллы оксалата кальция.

При рассмотрении эпидермиса плода с поверхности должны быть видны четырех-шестиугольные клетки с равномерно утолщенными стенками и желто-коричневым содержимым. На поверхности эпидермиса редкие одиночные одноклеточные, слегка извилистые, на концах заостренные, толстостенные волоски. Мякоть плода состоит из клеток округлой или овальной формы, содержащих клетки с кристаллическим песком оксалата кальция. При рассмотрении "давленого" препарата плода виден эпидермис кожуры семени, который состоит из характерных палисадных клеток с неравномерно утолщенной оболочкой, и каплями масла.

При рассмотрении микропрепарата стебля должны быть видны продольно вытянутые клетки эпидермиса с прямыми стенками и продольной складчатой кутикулой, устьица анизоцитного типа, на поверхности встречаются волоски, характерные для сырья красавки. Паренхима стебля состоит из тонкостенных клеток овальной или вытянутой формы, встречаются механические волокна, продольно вытянутые клетки

скристаллическим песком оксалата кальция, сосуды спирального, кольчатого и сетчатого типа.



Рисунок– Красавки трава.
1 – фрагмент эпидермиса листа: а – устьица анизоцитного типа, б – складчатость кутикулы, в – головчатый волосок (200×), 2 – фрагмент

сильно извилистых клеток эпидермиса лепестка (200×), 3 – сосочковидные выросты на эпидермисе лепестка (200×), 4 – фрагмент эпидермиса плода (200×), 5 – простой волосок (40×), 6 – головчатый волосок (200×), 7 – губчатая паренхима (а) и клетки с кристаллическим песком (б) (200×), 8 – фрагмент семени: а – палисадные клетки с неравномерно утолщенной оболочкой, б – капли масла (200×), 9 – сосуд кольчатого типа (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят20 мкл испытуемого раствора (см. «Количественное определение» приготовление раствора 2). Пластинку с нанесенной пробой сушат при комнатной температуре, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин системой растворителей ацетон – аммиака раствор 10 % (95:5), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и обрабатывают реактивом Драгендорфа.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться доминирующая зона адсорбции оранжевого цвета; допускается обнаружение других зон адсорбции (алкалоиды).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность.*Цельное сырье,измельченное сырье* – не более 13 %.

Зола общая.*Цельное сырье,измельченное сырье* – не более 13 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте.*Цельное сырье,измельченное сырье* – не более 3 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье*: частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, –не более 5 %; *измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером7 мм, –не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, –не более 5 %.

Посторонние примеси

Листья.*Цельное сырье*–не менее 45 %.

Частицы сырья, изменившие окраску.*Цельное сырье,измельченное сырье* – не более 4 %.

Органическая примесь*.Цельное сырье,измельченное сырье* – не более 0,5 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье*: сумма алкалоидов в пересчете на гиосциамин –не менее 0,35 % и не более 0,4 %.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм.Около 10,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 150 мл эфира, 7 мл аммиака раствора и взбалтывают в течение1 ч. Эфирное извлечение быстро фильтруют через вату в колбу вместимостью 200 мл, прикрывая воронку часовым стеклом. К фильтрату прибавляют 5 мл воды, энергично взбалтывают и оставляют в покое до

просветления эфирного слоя, после чего 90 мл эфирного извлечения переносят в делительную воронку вместимостью 200 мл. Цилиндр дважды ополаскивают эфиром порциями по 10 мл, которые присоединяют к эфирному извлечению в делительной воронке.

Из эфирного извлечения алкалоиды экстрагируют последовательно 20, 15, 10 мл хлористоводородной кислоты 1 % до полного их извлечения (проба с реактивом Майера), каждый раз фильтруя полученное извлечение через смоченный водой бумажный фильтр диаметром 5 см во вторую делительную воронку вместимостью 200 мл. Фильтр промывают дважды хлористоводородной кислотой 1 % по 5 мл, присоединяя промывную жидкость к общему кислотному извлечению.

Кислотное извлечение подщелачивают раствором аммиака до щелочной реакции по фенолфталеину и алкалоиды извлекают последовательно 20, 15, 10 мл хлороформа, взбалтывая по 3 мин каждый раз, и хлороформное извлечение фильтруют в колбу для отгонки вместимостью 100 мл через бумажный фильтр, на который предварительно помещают4 – 5 г свежепрокаленного натрия сульфата безводного, смоченного хлороформом. Фильтр промывают хлороформом дважды по 5 мл (раствор 2). Хлороформ отгоняют на роторном испарителе до объема около 1 – 2 мл, остаток хлороформа в колбе удаляют продуванием воздуха до полного исчезновения запаха растворителя. Сухой остаток растворяют в 15 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,02 Мпри подогревании на водяной бане при температуре 60 °С, прибавляют 0,1 млметилового красного спиртового раствора 0,1 %и 0,02 мл метиленового синего спиртового раствора, и избыток хлористоводородной кислоты титруютнатрия гидроксида раствором 0,02 М до появления зеленой окраски.

Содержание суммы алкалоидов в пересчете на гиосциамини абсолютно сухое сырье в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(15 - V) \cdot 0{,}005780 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot (100 - W)} = \frac{(15 - V) \cdot 57{,}8}{a \cdot (100 - W)},$$

где V – объем натрия гидроксида раствора 0,02 М, пошедшего на титрование, мл;

0,005780 – количество алкалоидов в пересчете на гиосциамин, соответствующее 1 мл 0,02 М раствора хлористоводородной кислоты;

a – навеска сырья, соответствующая объему эфирного извлечения, взятого на анализ, г;

W – влажность сырья, %.

Примечание. В случае завышенного содержание суммы алкалоидов (в пересчете на гиосциамин в % расчет количества лекарственного растительного сырья необходимого для производства лекарственного препарата следует проводить по формуле, приведенной в ОФС «Лекарственное растительное сырье. Фармацевтические субстанции растительного происхождения».

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Кровохлебки лекарственной корневища и корни
Sanguisorbae officinalis rhizomata et radices

ФС.2.5.0078.18

Взамен ФС 42-1082-76

Собранные осенью, очищенные от остатков надземных частей, отмытые от земли и высушенные корневища и корни дикорастущего, многолетнего травянистого растения кровохлебки лекарственной – *Sanguisorba officinalis* L. сем. розоцветных – *Rosaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырьё.* Цельные или разрезанные на куски одревесневшие корневища с отходящими от них немногочисленными корнями и отдельные корни. Длина корневищ и корней до 20 см, толщина корневищ 0,5 - 2,5 см, корней 0,3 - 1,5 см. Поверхность корневищ и корней гладкая или слегка продольно-морщинистая. Излом у корневищ неровный, у корней более ровный, под лупой у корневищ заметно лучистое строение. Цвет корневищ и корней снаружи темно-коричневый, почти черный, на изломе желтоватый или коричневато-желтый. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения вяжущий.

Измельченное сырье. При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки корневищ и корней различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 5 мм. Цвет желтоватый, коричневато-желтый, темно-коричневый и почти черный. Запах отсутствует, вкус водного извлечения вяжущий.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении поперечного среза корня должно быть видно, что корень имеет беспучковое строение, темно-коричневая пробка состоит из мелких клеток. Кора

широкая. Под пробкой располагаются 2-3 слоя крупных тангентально вытянутых клеток паренхимы с утолщенными оболочками. Внутренняя кора рыхлая, в периферической части с межклетниками, в ней иногда встречаются лубяные волокна со слабоутолщенной, неодревесневшей оболочкой, расположенные одиночно или группами по 2-3. Камбиальная зона хорошо выражена. Древесина рассеянно-сосудистая, представлена сосудами, волокнами либриформа и паренхимой. Сердцевинные лучи многочисленные, узкие, однорядные, на границе с наружной корой часто изогнуты. Крахмальные зерна мелкие, овальные или округлые, простые, реже сложные 5-7 мкм в диаметре. В паренхимных клетках часто встречаются крупные друзы. Корневище отличается от корня наличием в центре сердцевины.

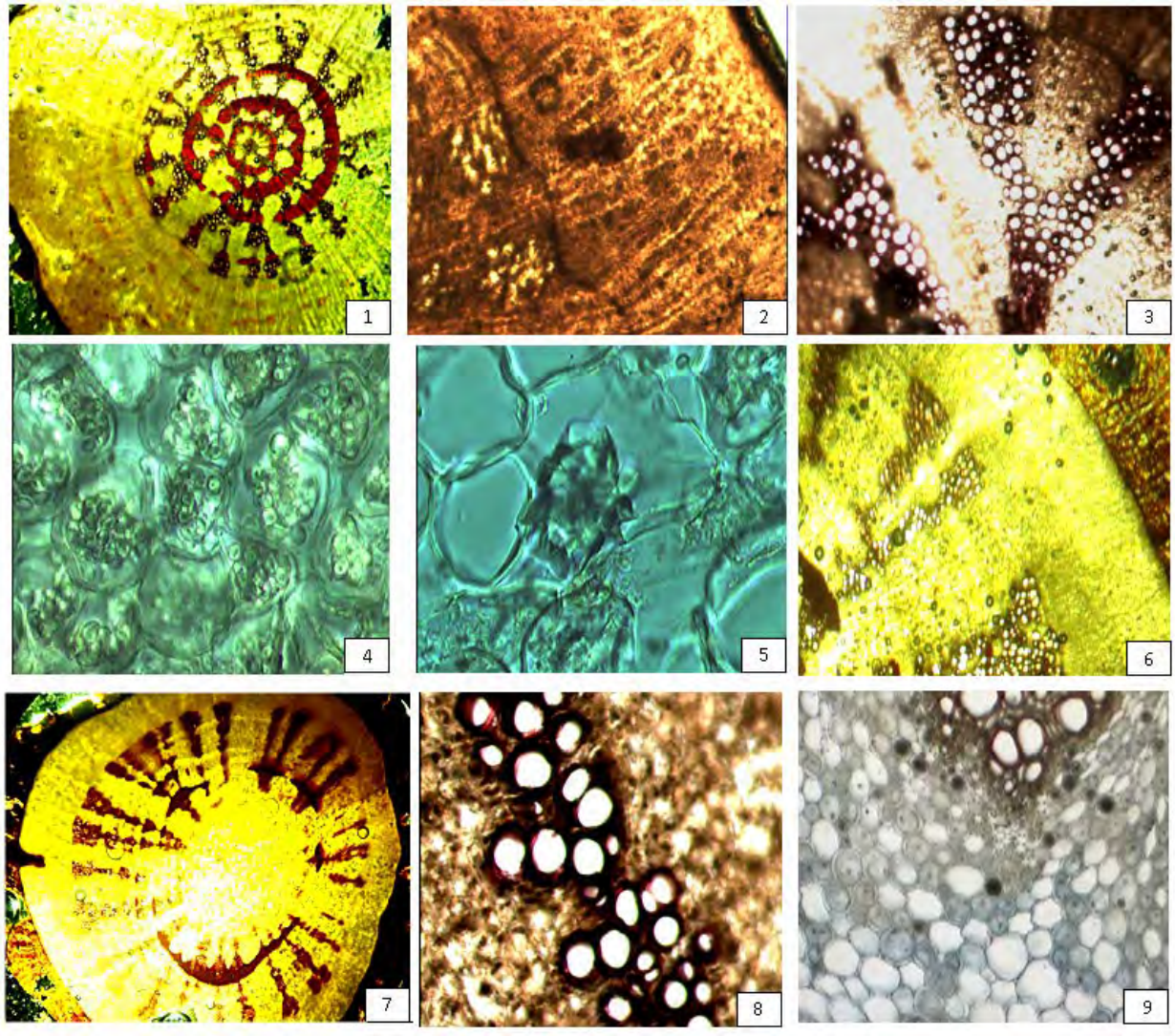


Рисунок – Кровохлебки лекарственной корневища и корни

1 – вторичное строение корня кровохлебки: общий вид (800 ×); 2 – корень кровохлебки: камбиальное кольцо; 3 – корень кровохлебки: сосуды ксилемы, вторичная флоэма, камбиальное кольцо (200 ×). 4 – корень кровохлебки: крахмальные зерна (800 ×); 5 – корень кровохлебки: друзы оксалата кальция (800 ×); 6 – корневище кровохлебки: 4–5 рядов мелких клеток пробки; клетки паренхимы первичной коры; межклетники; между проводящими элементами мощные сердцевидные лучи (200 ×). 7 – корневище кровохлебки: перидерма, кора, сердцевидные лучи; центральный цилиндр, сердцевина (800 ×); 8 – корневище кровохлебки: группы сосудов ксилемы; механические клетки в ксилеме (200 ×); 9 – корневище кровохлебки: крупные паренхимные клетки сердцевины; крахмальные зерна; друзы оксалата кальция (200 ×).

На поперечном срезе корневища кровохлебки видно, что оно имеет пучковое строение, покровная ткань – пробка, состоящая из прямостенных таблитчато расположенных, тонкостенных клеток темно-коричневого цвета. Под пробкой залегает Коровая тонкостенная паренхима, клетки которой слегка округлые. Корневище имеет пучковое строение. Эндодерма выражена. Флоэмные элементы представлены мелкими тонкостенными клетками. Линия камбия четко выражена в пучках и также выражен межпучковый камбий. Сосуды в поперечном сечении округлые или радиально-овальные, в радиальных группах. Преобладают в основном спиральные, пористые, сетчатые или лестничные сосуды. Друзы оксалата кальция представлены в первичной коре и сердцевине. Сердцевина занимает большой объем и состоит из крупноклеточной, тонкостенной паренхимы. Включения в виде крахмальных зерен имеются в коровой паренхиме и сердцевине. Крахмальные зерна мелкие.

Измельченное сырье. При рассмотрении «давленого» микропрепарата должны быть видны фрагменты темно-коричневой пробки; фрагменты паренхимы с крупными клетками, содержащими друзы оксалата кальция; фрагменты паренхимных клеток с крахмальными зернами; фрагменты сетчатых и спиральных сосудов; редкие лубяные волокна, их обрывки; отдельные зерна крахмала и друзы оксалата кальция.

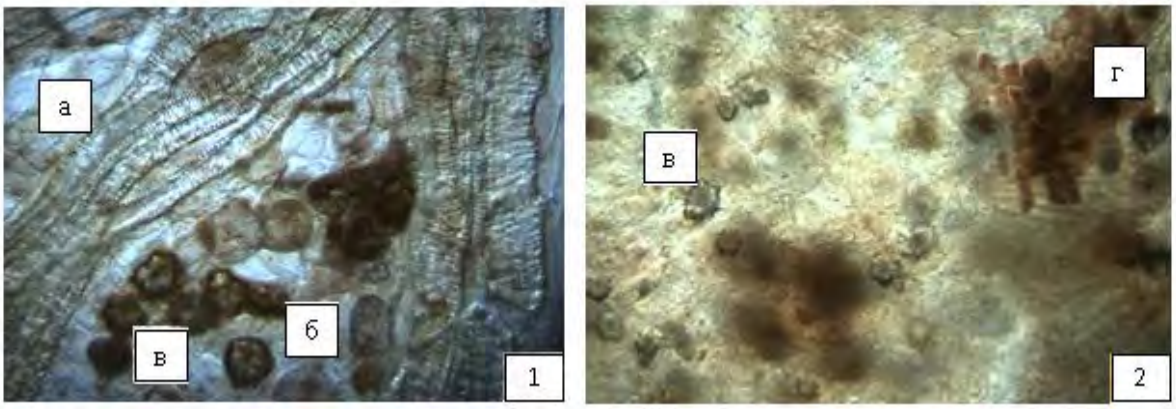


Рисунок 2 – Кровохлебки корневища и корни.
1 – «давленый» микропрепарат: а – фрагменты сосудов (200×); б – клетки паренхимы (200×) в – друзы оксалата кальция (200×); 2 – «давленый» микропрепарат: в – друзы оксалата кальция (200×); г – фрагмент пробки (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ.

Приготовление растворов

Раствор стандартного образца (СО) галловой кислоты. Около 0,05 г СО галловой кислоты растворяют в 50 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора 1 мес при хранении в защищенном от света месте.

Тонкослойная хроматография

Около 0,5 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, помещают в круглодонную колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 5 мл спирта 50 %, нагревают на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 10 мин. Колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры и полученное

извлечение фильтруют через бумажный фильтр в колбу вместимостью 25 мл. Экстракцию повторяют еще раз. Извлечение фильтруют в ту же колбу объемом 25 мл (испытуемый раствор).

На линию старта высокоэффективной хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят в виде полос длиной 10 мм и шириной не более 2 мм 5 мкл (0,005 мл) испытуемого раствора, рядом – 2 мкл (0,002 мл) раствора СО галловой кислоты. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре в течение 5 мин, затем помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 40 мин смесью растворителей этилацетат – толуол – кислота муравьиная безводная – вода (30:10:5:2) и хроматографируют восходящим способом.

Когда фронт растворителей пройдет не менее 8 см от линии старта, пластинку вынимают из камеры, высушивают до удаления следов растворителей под тягой при комнатной температуре, хроматограмму опрыскивают раствором железа(III) хлорида спиртовым раствором 1 % и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме СО галловой кислоты должна обнаруживаться зона темно-синего цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должно обнаруживаться не менее трех зон синего цвета ниже зоны адсорбции галловой кислоты и зона синевато-коричневого цвета на уровне зоны галловой кислоты; допускается обнаружение других зон адсорбции.

Качественная реакция

Около 0,1 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, кипятят 2 - 3 мин с 10 мл воды. Охлаждают до комнатной температуры и фильтруют через бумажный фильтр. К 2 - 3 мл фильтрата прибавляют 1 каплю железа(III) аммония сульфата раствора 10 % или 2 - 3 капли железа(III) хлорида раствора 3 %; должно наблюдаться интенсивное сине-черное окрашивание (дубильные вещества).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 13 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 12 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 5 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм – не более 5 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм – не более 5 %.

Посторонние примеси

Потемневшие в изломе корневища и корни. *Цельное сырье* – не более 10 %.

Других частей растения. *Цельное сырье, измельченное сырье* - не более 3 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье:* содержание суммы дубильных веществ в пересчете на танин – не менее 14 %.

Определение дубильных веществ в пересчете на пирогаллол проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах», метод 1.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Крушины ольховидной кора **ФС.2.5.0021.18**

Frangulae alni cortex **Взамен ФС.2.5.0021.15**

Собранная весной до начала цветения кора стволов и ветвей дикорастущего кустарника или небольшого деревца крушины ольховидной (син.: крушина ломкая) – *Frangula alnus* Mill. (syn.: *Rhamnus frangula* L.), сем. крушиновых – *Rhamnaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье*. Трубчатые или желобоватые куски коры различной длины, толщиной 0,5 – 2 мм. Наружная поверхность коры более или менее гладкая, темно-коричневая, серо-коричневая, темно-серая или серая, часто с беловатыми поперечно-вытянутыми чечевичками или серыми пятнами, при легком соскабливании наружной части пробки обнаруживается красный слой. Внутренняя поверхность гладкая, желтовато-оранжевого или красновато-коричневого цвета. При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) излом светло-желтый, равномерно мелкощетинистый. Запах слабый. Вкус водного извлечения горьковатый.

Измельченное сырье. Смесь кусочков коры различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет коры с наружной стороны темно-коричневый, серо-коричневый, темно-серый или серый, с внутренней - желтовато-оранжевый или красновато-коричневый. Запах слабый. Вкус водного извлечения горьковатый.

Порошок. При рассмотрении порошка под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видна смесь частиц коры желтовато-коричневого

цвета с коричневыми, темно-коричневыми, серо-коричневыми, темно-серыми, серыми вкраплениями, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Запах слабый. Вкус водного извлечения горьковатый.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении поперечного среза должен быть виден темно-красный, широкий пробковый слой в 10 – 20 рядов клеток, прерванный во многих местах чечевичками. Далее лежит пластинчатая колленхима. Наружная кора состоит из овальных клеток и содержит большое количество друз оксалата кальция; в некоторых клетках встречаются крахмальные зерна. Механические волокна с мало утолщенными и слабо одревесневшими оболочками. Сердцевинные лучи часто изогнутые, одно-, двух-, реже трехрядные с желтым содержимым. Между сердцевинными лучами расположены группы желтоватых одревесневших лубяных волокон с толстыми стенками, окруженные кристаллоносной обкладкой и образующие концентрические пояса.

Измельченное сырье. При рассмотрении "давленого"препарата должны быть видны фрагменты темно-красной пробковой ткани, группы желтоватых одревесневших лубяных волокон с кристаллоносной обкладкой, друзы, одиночные кристаллы оксалата кальция.

Порошок. При рассмотрении микропрепарата должны быть видны фрагменты темно-красной пробковой ткани; группы желтоватых одревесневших лубяных волокон с толстыми стенками, окруженные кристаллоносной обкладкой; друзы и одиночные кристаллы оксалата кальция.

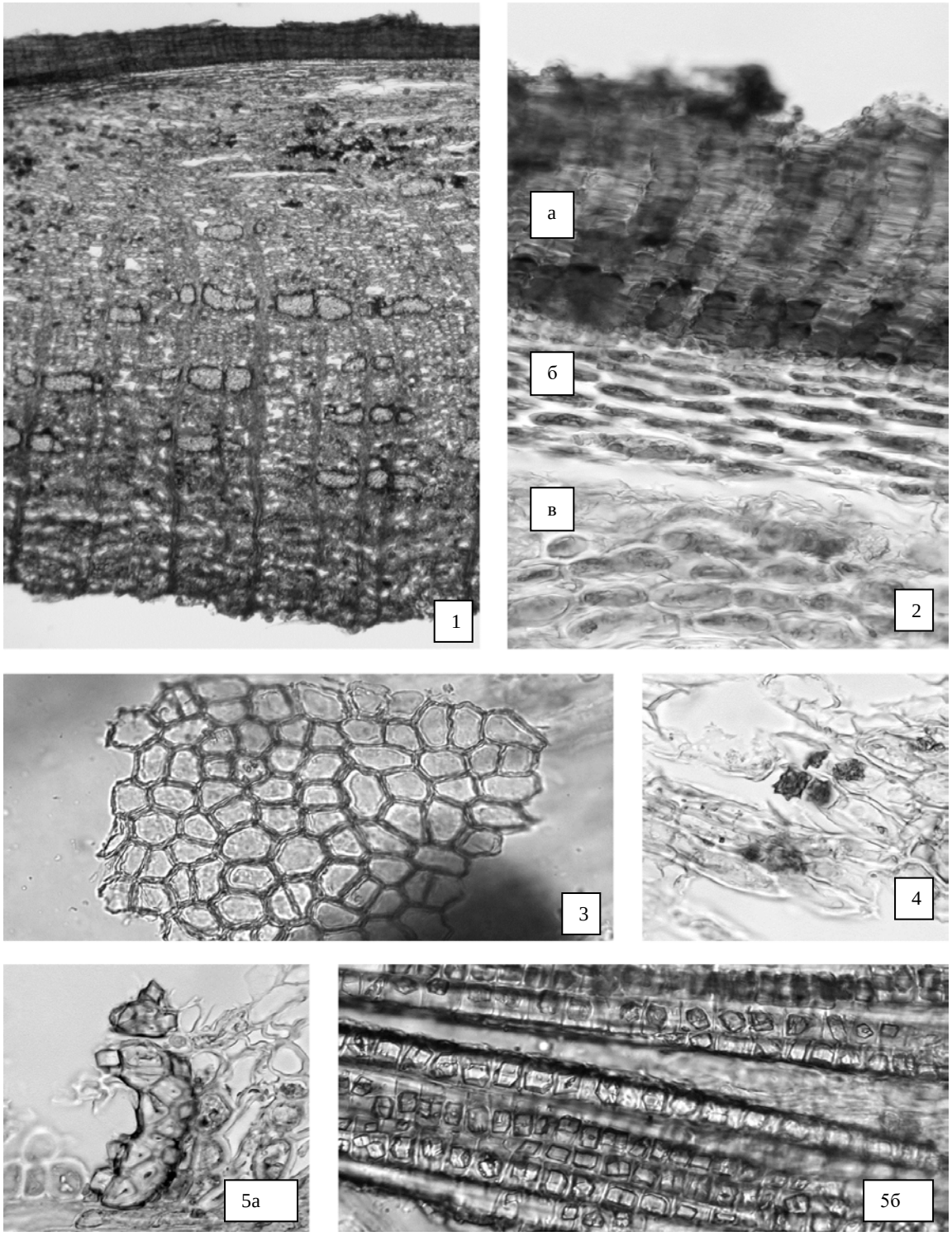


Рисунок – Крушины ольховидной кора.

1 – поперечный срез коры (40×), 2 – фрагмент поперечного среза коры: а – пробка, б – колленхима, в – первичная кора (200×), 3 – фрагмент пробки (200×), 4 – фрагмент паренхимы с друзами оксалата кальция (200×), 5 – фрагмент лубяных волокон с кристаллоносной обкладкой: а – поперечный срез, б – "давленый" препарат (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

1. ***Тонкослойная хроматография***

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) барбалоина. Около 0,005 г СО барбалоина (алоина) растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в хорошо укупоренной упаковке, в прохладном защищенном от света месте.

Около 0,5 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 5 мл спирта 96 % и нагревают с обратным холодильником на водяной бане до кипения. После охлаждения полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 5 мкл испытуемого раствора и рядом 10 мкл раствора СО барбалоина.

Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре в течение 5 мин, помещают в камеру (выложенную изнутри фильтровальной бумагой), предварительно насыщенную в течение не менее 60 мин смесью растворителей этилацетат–спирт 96 %–вода (100:17:13), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет 80–90 % длины пластинки от линии старта, пластинку вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, обрабатывают калия гидроксида раствором 5 % в спирте 50 %, сушат в сушильном шкафу при температуре 100–105 °С в течение 3–5 мин и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО барбалоина должна обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией коричнево-желтого, зелено-желтого или желтого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться 2 зоны адсорбции с флуоресценцией оранжево-красного или оранжевого цвета, допускается обнаружение других зон адсорбции; не допускается обнаружение зоны от желтого до красно-оранжевого цвета на уровне зоны

адсорбции СО барбалоина (антраценпроизводные).

2. ***Качественные реакции***

При смачивании внутренней поверхности коры или порошка коры1–2 каплями натрия гидроксида раствора 10 % должно наблюдаться кроваво-красное окрашивание (антраценпроизводные).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 15 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 5 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 0,6 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, – не более 5 %.*Измельченное сырье* – частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, –не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, –не более 5 %.*Порошок* – частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Участки коры, покрытые кустистыми лишайниками. *Цельное сырье* – не более 1 %.

Участки коры с остатками древесины. *Цельное сырье* – не более 1 %.

Куски коры толще 2 мм. *Цельное сырье* – не более 3 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 0,5 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС

«Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок:* сумма антрагликозидов в пересчете на глюкофрангулин А–не менее 6 %.

Для анализа используется эфир диэтиловый квалификации «химически чистый».

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм. Около 0,25 г (точная навеска) сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 25 мл спирта 80 %, взвешивают с погрешностью ± 0,01 г, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане в течение 15 мин. После охлаждения до комнатной температуры колбу вновь взвешивают и доводят до первоначальной массы спиртом 80 %. Содержимое колбы фильтруют через бумажный складчатый фильтр.

5,0 мл фильтрата помещают в делительную воронку вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл воды и 0,1 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и осторожно взбалтывают в течение 2–3 мин с 20 мл петролейного эфира (х.ч.). После полного расслоения фаз нижний водный слой переносят в стакан вместимостью 100 мл, верхний эфирный слой переносят в колбу вместимостью 250 мл. Далее водный слой из стакана переносят в ту же делительную воронку и аналогичным образом обрабатывают еще 4 раза петролейным эфиром (порциями по 20 мл). Водный

слой переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл. Объединенные петролейные извлечения переносят обратно в делительную воронку и промывают водой 2 раза (порциями по 15 мл), водный слой помещают в ту же мерную колбу вместимостью 100 мл, оставляя темные хлопья в эфирном слое. В мерную колбу с объединенными водными извлечениями прибавляют 5 мл натрия карбоната раствора 5 % и доводят объем раствора водой до метки (раствор А).

50,0 мл раствора А пипеткой переносят в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 20 мл железа(III) хлорида раствора (плотность 1,07–1,08), присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане при периодическом перемешивании в течение 20 мин, погружая колбу в воду бани выше уровня раствора в колбе. Затем в колбу прибавляют 2 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и продолжают нагревать в течение 20 мин, часто встряхивая, до растворения осадка.

Колбу охлаждают, и ее содержимое переносят в делительную воронку вместимостью 500 мл, колбу ополаскивают 30 мл эфира, присоединяют к основному раствору в делительной воронке и осторожно взбалтывают в течение 2–3 мин. После полного расслоения фаз нижний водный слой переносят в ту же колбу вместимостью 250 мл, а эфирный слой собирают в колбу вместимостью 100 мл. Извлечение повторяют еще 2 раза аналогичным образом. Объединенные эфирные извлечения переносят обратно в делительную воронку и промывают 2 раза водой (по 15 мл), водный слой отбрасывают. Эфирные извлечения фильтруют через воронку с бумажным фильтром, содержащим 3,0 г натрия сульфата безводного, в мерную колбу вместимостью 100 мл. Воронку с натрия сульфатом безводным промывают эфиром и доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (раствор Б).

Через 60 мин 20,0 мл раствора Б пипеткой переносят в низкий стеклянный стакан или бюкс вместимостью 100 мл и сушат досуха в

вытяжном шкафу. Сухой остаток полностью растворяют в 10 мл магния ацетата раствора спиртового 0,5 % (раствор В).

Оптическую плотность раствора В измеряют на спектрофотометре при длине волны 515 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения спирт 96 %.

Содержание суммы антрагликозидов в пересчете на глюкофрангулин А и абсолютно сухое сырье в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 10 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 5 \cdot 50 \cdot 20 \cdot (100 - W)} = = \frac{A \cdot 50000}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора В;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения глюкофрангулина А при длине волны 515 нм, равный 204;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Кукурузы столбики с рыльцами	**ФС.2.5.0079.18**
Zeae maydis styli cum stigmatis	**Взамен ГФ XI, вып. 2, ст. 82**
	(изм. № 1 от 24.01.1997)

Собранные в период созревания початков и высушенные столбики с рыльцами культивируемого однолетнего травянистого растения кукурузы – *Zea mays* L., сем. мятликовых – *Poaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Мягкие шелковистые нити (столбики), собранные пучками или частично перепутанные, на верхушке которых находятся двухлопастные рыльца. Столбики несколько искривленные, плоские, шириной 0,1 - 0,15 мм; длиной 0,5 - 20 см, рыльца короткие, длиной 0,4 - 3 мм. Часто встречаются столбики без рылец.

Цвет коричневый, коричнево-красный, светло-желтый. Запах слабый, своеобразный. Вкус водного извлечения с ощущением слизистости.

Измельченное сырье. Смесь нитевидных кусочков столбиков и рылец, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм. Цвет коричневый, коричнево-красный, светло-желтый. Запах слабый, своеобразный. Вкус водного извлечения с ощущением слизистости.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье, измельченное сырье.* При рассмотрении микропрепаратов столбиков с рыльцами кукурузы с поверхности должны быть видны клетки эпидермиса удлиненной формы с прямыми стенками, редкие простые волоски двух типов: продольноспаянные многоклеточные волоски длиной 0,2 - 0,8 мм с заостренной или конической верхушкой, состоящие из 2 - 3 ярусов клеток в длину, и многоклеточные тонкостенные изогнутые волоски.

В паренхиме двух узких сторон столбиков и рылец должны быть два параллельных проводящих пучка с хорошо заметными спиральными, кольчатыми и лестничными сосудами. Рыльца встречаются крайне редко. На рыльце должны быть заметны многоклеточные ворсинки.

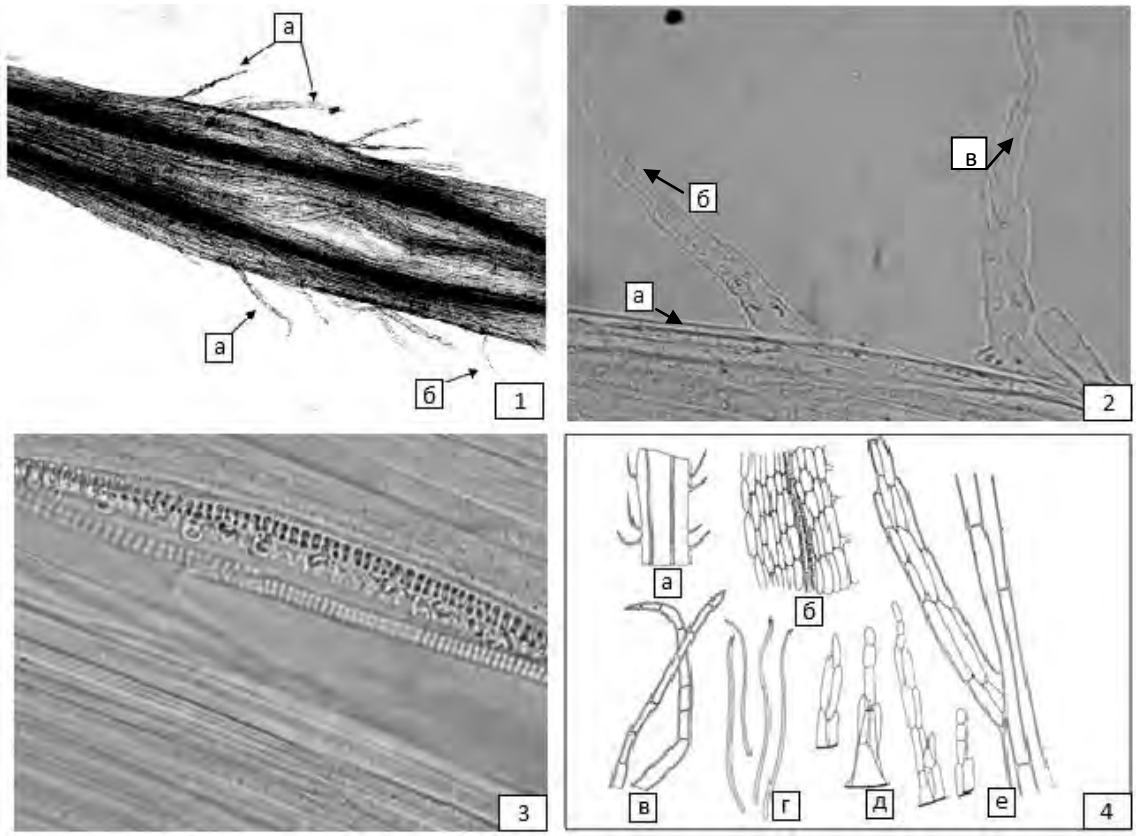


Рисунок 1 – Кукурузы столбики с рыльцами

1 – фрагмент столбика. Общий вид: а – продольноспаянный многоклеточный волосок, б – простой многоклеточный тонкостенный изогнутый волосок (40×); 2 – фрагмент столбика: а – клетки эпидермиса удлиненно-прямоугольной формы с прямыми стенками, б – продольноспаянный многоклеточный волосок, в – простой многоклеточный тонкостенный волосок (200×); 3 – спиральные и кольчатые сосуды проводящего пучка (200×); 4 – схема строения основных диагностических признаков кукурузы столбиков с рыльцами: а – участок столбика с ворсинками (50×), б – участок паренхимы с проводящим пучком (100×), в – простые многоклеточные волоски (280×), г – ворсинки (200×), д – сложные волоски (200×), е – клетки эпидермиса со сложными волосками (280×).

Определение основных групп биологически активных веществ.

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира 1 %. 0,1 г дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора 1 мес.

Раствор стандартного образца (СО) лютеолин-7-гликозида. Около 0,01 г СО лютеолин-7-гликозида растворяют при нагревании на водяной бане в 10 мл спирта 60 %. Срок годности раствора 3 мес.

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором наносят 20 мкл (0,02 мл) испытуемого раствора А (см. раздел «Количественное определение») и 10 мкл (0,01 мл) раствора СО лютеолин-7-гликозида. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 2 ч смесью растворителей этилацетат – муравьиная кислота – вода (86:16:16), и хроматографируют восходящим способом.

Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей. Затем хроматограмму опрыскивают дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира раствором 1 % и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО лютеолин-7-гликозида должна обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией желтого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны наблюдаться зона адсорбции с флуоресценцией желтого цвета на уровне зоны адсорбции СО лютеолин-7-гликозида и зона адсорбции с флуоресценцией желтого или желто-зеленого цвета выше зоны адсорбции СО лютеолин-7-гликозида; допускается обнаружение других зон адсорбции.

Качественная реакция

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм. 1,0 г измельченного сы-

рья помещают в коническую колбу вместимостью 200 – 250 мл, прибавляют 50 мл спирта 70 %, присоединяют колбу к обратному холодильнику, нагревают, поддерживая слабое кипение, в течение 1 часа. После охлаждения до комнатной температуры содержимое колбы фильтруют. 10 мл извлечения выпаривают до густого осадка, остаток обрабатывают 5 мл спирта 96 %, фильтруют. К 2 мл фильтрата прибавляют 5 – 7 капель хлористоводородной кислоты концентрированной и 10 – 15 мг цинка металлического, нагревают на водяной бане; должно наблюдаться розовое окрашивание (флавоноиды).

К 2 мл настоя (1:20) прибавляют несколько капель раствора свинца(II) ацетата; должно наблюдаться выпадение осадка (сапонины).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 13 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 7 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 2,5 %.

Измельченность сырья. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,2 мм – не более 5 %.

Посторонние примеси

Почерневших столбиков с рыльцами. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3 %.

Органическая примесь*. Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 0,5 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье:* экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 70 % – не менее 15 %; суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-гликозид – не менее 0,35 %.

Экстрактивные вещества.

В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1, из навески 1,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, экстрагент – спирт 70 %).

Сумма флавоноидов.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Около 2,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в плоскодонную колбу вместимостью 100 мл и прибавляют 50 мл спирта 60 %. Колбу с содержимым взвешивают с погрешностью (± 0,01) и кипятят на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 2 часов. Полученный экстракт охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и при необходимости доводят массу спиртом 60 % до первоначальной. Полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр «красная лента», отбрасывая первые 10 мл (раствор А).

1,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 1 мл алюминия хлорида раствора 3 % в спирте 60 %, 0,1 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, доводят объем раствора спиртом 60 % до

метки и перемешивают (испытуемый раствор). Через 40 мин измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 405 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения.

В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1,0 мл раствора А, 0,1 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, помещенный в мерную колбу вместимостью 25 мл и доведенный спиртом 60 % до метки.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-гликозид (X) в процентах в абсолютно сухом сырье вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 125000}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;
a – навеска сырья, г;
$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса лютеолин-7- гликозида с алюминия хлоридом при длине волны 405 нм, равный 401;
W – влажность сырья, %.

Примечание. Определение содержания экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 70 %, определяется в сырье, предназначенном для производства экстрактов.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Ламинарии слоевища **ФС.2.5.0080.18**

(морская капуста)

Laminariae thalli **Взамен ГФ XI ст. 83**

Собранные с июня по октябрь и высушенные слоевища бурых морских водорослей ламинарии японской – *Laminaria japonica Aresch*. и ламинарии сахаристой – *Laminaria saccharina* (L.) *Lam.,* сем. ламинариевых – *Laminariaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Слоевища ламинарии японской – плотные, кожистые, лентообразные пластины, сложенные по длине, без стволиков или куски пластин длиной не менее 15 см, шириной не менее 7 см. Толщина пластин не менее 0,03 см; края пластин цельные, волнистые.

Слоевища ламинарии сахаристой – плотные, кожистые, морщинистые листовидные пластины без стволиков или их куски длиной не менее 10 см, шириной не менее 5 см. Толщина пластин не менее 0,03 см. Края пластин волнистые.

Допускается наличие пластин с разрывами по краям и середине.

Цвет цельных слоевищ от светло-зеленого до темно-зеленого; зеленовато-коричневый, красно-коричневый, иногда желтовато-коричневый, светло-коричневый, зеленовато-черный; снаружи слоевища покрыты белым налетом солей. Запах характерный. Вкус солоноватый.

Шинкованное сырье. Полоски слоевищ шириной 0,2 – 0,4 см, толщиной не менее 0,03 см. Цвет от светло-зеленого до темно-зеленого; зеленовато-коричневый, светло-коричневый, красно-коричневый, иногда желтовато-коричневый, светло-коричневый, зеленовато-черный; снаружи полоски слое-

вищ покрыты белым налетом солей. Запах характерный. Вкус солоноватый.

Измельченное сырье. Кусочки слоевищ различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 3 мм. Цвет от светло-зеленого до темно-зеленого; зеленовато-коричневый, светло-коричневый, красно-коричневый, иногда желтовато-коричневый, зеленовато-черный; снаружи кусочки слоевищ покрыты белым налетом солей. Запах характерный. Вкус солоноватый.

***Микроскопические признаки**. Цельное, шинкованное и измельченное сырье.* При рассмотрении слоевищ с поверхности должен быть виден эпидермис, состоящий из мелких, почти квадратных клеток с толстыми стенками, сквозь которые просвечивают многочисленные округлые слизистые вместилища.

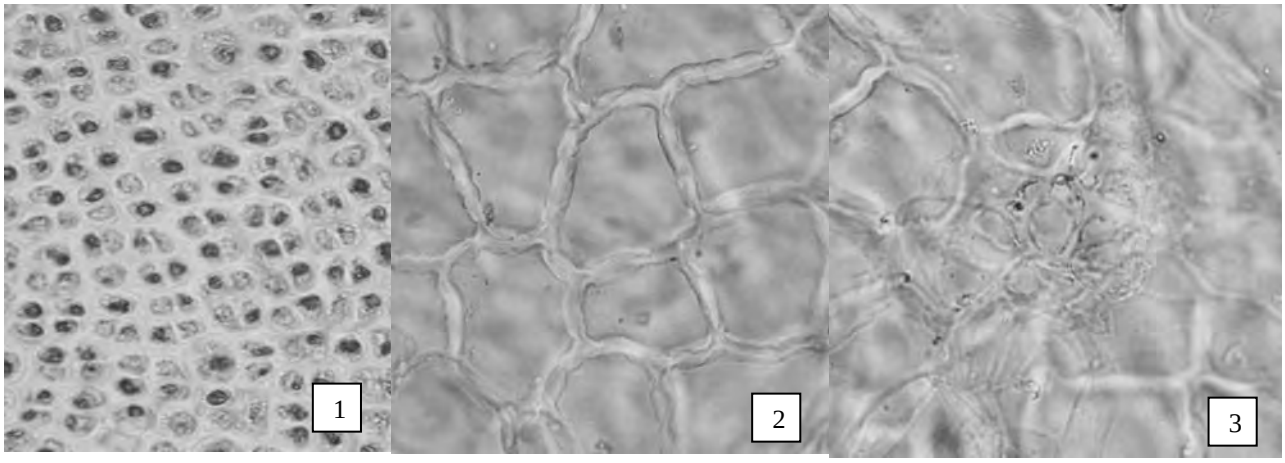


Рисунок 1 – Ламинарии слоевища (морская капуста)
1 – фрагмент эпидермиса (400×); 2 – фрагмент эпидермиса (200×);
3 – вместилище со слизью в паренхиме (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Качественные реакции

1. Измельченное сырье в количестве 0,04 г (см. раздел «Количественное определение. Определение содержания йода») насыпают на кусочек целлофана размером 2 × 2 см, который сворачивают в виде пакетика, помещают в фиксатор и сжигают в колбе с кислородом вместимостью 300 – 400 мл (в соответствии с ОФС «Метод сжигания в колбе с кислородом»). В качестве поглощающей жидкости используют

10 мл крахмала раствора 0,5 %, содержащего 0,2 % сульфаминовой кислоты; должно наблюдаться голубое окрашивание (при наличии йода в морской капусте в количестве не менее 0,1 %).

2. К 10 мл раствора А (см. раздел «Количественное определение. Определение содержания полисахаридов») прибавляют 10 мл спирта 96 %, перемешивают; должны наблюдаться хлопьевидные сгустки, выпадающие в осадок при стоянии (полисахариды).

3. Раствор с осадком фильтруют через стеклянный фильтр ПОР 16, осадок с фильтра переносят в пробирку, прибавляют 2 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 %, нагревают, затем прибавляют 10 мл медно-тартратного реактива и снова нагревают; должен наблюдаться оранжево-красный осадок (восстанавливающие сахара).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, шинкованное сырье, измельченное сырье* – не более 15 %.

Зола общая. *Цельное сырье, шинкованное сырье, измельченное сырье* – не более 40 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, шинкованное сырье, измельченное сырье* – не более 20 %.

Измельченность сырья. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,2 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Слоевищ толщиной менее 0,03 см. *Цельное сырье, шинкованное сырье* – не более 15 %.

Слоевищ с пожелтевшими краями. Цельное сырье, шинкованное сырье – не более 10 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье, шинкованное сырье, измельченное сырье* – не допускается.

Минеральная примесь (ракушки, камешки). *Цельное сырье, шинкованное сырье* – не более 0,5 %.

Песок. *Цельное сырье, шинкованное сырье, измельченное сырье* – не более 0,2 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах». Предельно допустимое содержание мышьяка – 90 мг/кг.

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, шинкованное сырье, измельченное сырье.* Йода – не менее 0,1 %; полисахаридов – не менее 8 %.

Определение содержания йода

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм. Около 0,06 г (точная навеска) измельченного сырья помещают на кусочек целлофана (20 × 20 мм), который сворачивают в виде пакетика, помещают в фиксатор и сжигают в колбе с кислородом вместимостью 1000 мл (в соответствии с ОФС «Метод сжигания в колбе с кислородом»). В качестве поглощающей жидкости используют 2 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида и 50 мл воды. По окончании сжигания колбу интенсивно встряхивают в течение 3 мин, затем шлиф, держатель и внутренние стенки колбы промывают 100 мл воды, прибавляют в колбу по каплям до слабо-желтого окрашивания смесь, состоящую из 25 мл калия ацетата раствора 10 % в уксусной кислоте

ледяной и 15 капель брома. Колбу оставляют на 2 мин, прибавляют по каплям муравьиную кислоту 85 % до обесцвечивания раствора и через 1 мин прибавляют 3 мл сульфаминовой кислоты раствора 3 %.

Содержимое колбы в течение 3 мин периодически взбалтывают, затем прибавляют 1,0 г калия йодида и титруют выделившийся йод 0,005 М раствором натрия тиосульфата (индикатор – крахмал).

Содержание йода в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{0{,}0001058 \cdot \mathrm{V} \cdot 100 \cdot K \bullet 100}{a \cdot (100 - W)},$$

где 0,0001058 – количество йода, соответствующее 1 мл 0,005 М раствора натрия тиосульфата, г;

V – объем 0,005 М раствора натрия тиосульфата, израсходованного на титрование, мл;

К - Поправочный коэффициент к титру 0,005 М раствора натрия тиосульфата;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Определение содержания полисахаридов

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 10,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл воды и нагревают с обратным холодильником на электрической плитке в течение 30 мин, поддерживая слабое кипение. Извлечение декантируют в мерную колбу вместимостью 500 мл через 5 слоев марли, вложенной в стеклянную воронку диаметром 55 мм и предварительно смоченной водой. Экстракцию проводят еще 4 раза по 100 мл (каждый раз в течение 30 мин). Фильтр промывают водой, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (раствор А).

25,0 мл раствора А помещают в центрифужную пробирку вместимостью 150 мл, прибавляют 25 мл спирта 96 %, перемешивают, подогревают на водяной бане при 30 °С в течение 5 мин. Через 30 мин содержимое пробирки

центрифугируют с частотой вращения 5000 об/мин в течение 30 мин. Надосадочную жидкость фильтруют через высушенный до постоянной массы стеклянный фильтр ПОР 16 диаметром 40 мм под вакуумом при остаточном давлении 13 – 16 кПа. Затем осадок количественно переносят на тот же фильтр с помощью 10 мл смеси вода – спирт 96 % (1:1) и промывают 10 мл спирта 96 %. Фильтр с осадком высушивают на воздухе, доводят до постоянной массы при температуре 102 – 105 °С и взвешивают.

Содержание полисахаридов в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 500 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot 25 \cdot (100 - W)},$$

где m_1 – масса фильтра, г;
m_2 – масса фильтра с осадком, г;
a – навеска сырья, г;
W – влажность сырья, %.

Определение содержания песка

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 20,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в стакан вместимостью 150 мл, прибавляют 60 мл хлористоводородной кислоты разведенной 10 % и нагревают до кипения, непрерывно помешивая до прекращения вспучивания массы. Затем стакан накрывают часовым стеклом и продолжают нагревать в течение 15 мин. По окончании нагревания стакан доливают водой доверху, энергично размешивают содержимое стеклянной палочкой и оставляют на 3 – 5 мин, после чего приступают к отмучиванию песка. Для этого к водопроводному крану или большой бутыли с водой присоединяют при помощи резинового шланга пипетку вместимостью 5 – 10 мл и устанавливают ток воды со скоростью 160 – 170 мл/мин. Затем подставляют под ее струю стакан с анализируемой массой и погружают в него трубку на расстоянии 1 – 2 см от дна. Слив воды происходит через край стакана. Продолжительность отму-

чивания около 20 мин, после чего воду из стакана декантируют. Для удаления оставшихся частиц сырья осадок в стакане заливают 25 – 30 мл насыщенного раствора натрия хлорида, перемешивают и, дав песку осесть на дно, осторожно сливают жидкость вместе со взвешенными частицами сырья. Обработку раствором натрия хлорида повторяют 3 – 4 раза до полного удаления взвешенных частиц. Затем осадок в стакане промывают 2 – 3 раза водой и количественно переносят на беззольный фильтр.

Осадок вместе с фильтром озоляют во взвешенном тигле, помещают в муфельную печь, прокаливают в течение 15 мин при температуре 550 – 650 °С и после охлаждения взвешивают.

Содержание песка в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot (100 - W)},$$

где m_1 – масса пустого тигля, г;
m_2 – масса тигля с золой, г;
a – навеска сырья, г;
W – влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Ландыша трава **ФС.2.5.0022.15**

Ландыша листья

Ландышацветки

Convallariae herba

Convallariae folia

Convallariae flores

Собранная и высушенная трава (в период цветения), листья до цветения и в начале цветения, цветки (в период цветения) многолетнего дикорастущего травянистого растения ландыша майского – *Convallaria majalis* L., ландыша закавказского – *Convallaria transcaucasica* Utkin ex Grossh.и ландыша Кейске – *Convallaria keiskei* Mig.,сем.лилейных – *Liliaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки*. Цельное сырье. Трава.* Смесь цельных, реже изломанных листьев, соцветий с цветоносами, отдельных цветков и кусочков цветоносов. Листья эллиптической или ланцетовидной формы с заостренной верхушкой, суживающиеся у основания и постепенно переходящие в длинные замкнутые влагалища, отдельные или по 2 – 3охватывающие друг друга. Край листа цельный, жилкование дугонервное. Лист тонкий, ломкий, с голой и слегка блестящей поверхностью. Длина листьев до 20 см, ширина – до 8 см. Соцветие – односторонняя рыхлая кисть из 3–12 (20) желтоватых цветков на ребристом голом цветоносе, длиной до 20 см, толщиной до 1,5 мм. Цветки обоеполые с венчиковидным колокольчатым околоцветником, сростнолепестные, с 6 короткими отогнутыми зубчиками,

на коротких цветоножках, с пленчатыми линейными прицветниками. Цвет листьев зеленый, реже коричневато-зеленый, цветков – желтоватый, цветоносов – светло-зеленый. Запах слабый. Вкус водного извлечения не определяется (сырье ядовито).

*Листья.*Цельные, реже изломанные, эллиптической или ланцетовидной формы с заостренной верхушкой, суживающиеся у основания и постепенно переходящие в длинные влагалища; отдельные или соединенные вместе по 2–3, край листа цельный, жилкование дугонервное. Листовая пластинка, тонкая, ломкая, с голой и слегка блестящей поверхностью. Длина листьев до 20 см, ширина – до 8 см. Цвет листьев зеленый, реже коричневато-зеленый. Запах слабый. Вкус водного извлечения не определяется(сырье ядовито).

Цветки. Смесь соцветий с остатками цветоносов длиной до 20 см, цветков и иногда кусочков цветоносов. Цветонос ребристый, голый, толщиной до 1,5 мм, с односторонней рыхлой кистью из 3–12 (20) желтоватых цветков. Цветки обоеполые с венчиковидным колокольчатым околоцветником, сростнолепестные, с 6 короткими отогнутыми зубчиками, на коротких цветоножках, с пленчатыми линейными прицветниками. Тычинок 6, на коротких нитях, прикрепленных к основанию околоцветника; завязь верхняя, трехгнездная, столбик с расширенным трехлопастным рыльцем. Цвет цветоносов – светло-зеленый, цветков – желтоватый. Запах слабый. Вкус водного извлечения не определяется (сырье ядовито).

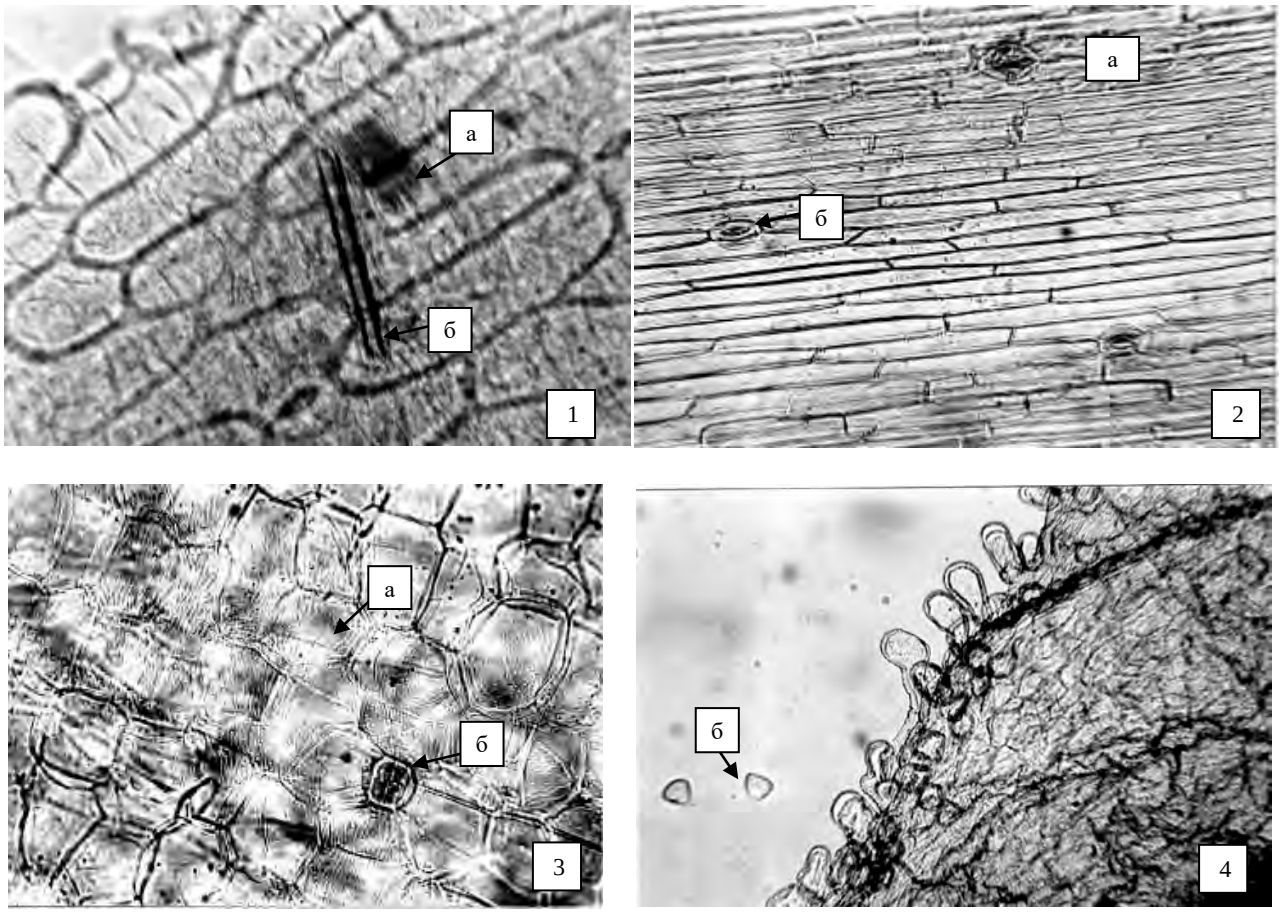
Измельченное сырье.Трава. При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) виднькусочки листьев (зеленого, реже коричневато-зеленого цвета), цветоносов (слабо-зеленого цвета) и цветков (желтоватого цвета), проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм. Запах слабый. Вкус водного извлечения не определяется (сырье ядовито).

Листья. Кусочки листьев различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм. Цвет листьев зеленый, реже коричневато-зеленый. Запах слабый. Вкус водного извлечения не определяется (сырье ядовито).

Микроскопические признаки.*Цельное сырье, измельченное сырье.Листья.* При рассмотрении листа с поверхности с обеих сторон должны быть видны вытянутые по длине листа клетки эпидермиса овальной, прямоугольной, широковеретеновидной, ромбовидной и комбинированной формы с прямыми стенками. Стенки клеток имеют четковидное утолщение. Устьица погруженные, овальные, окружены 4 клетками эпидермиса (тетрацитныйтип). Под верхним эпидермисом должны быть видны клетки палисадной ткани, вытянутые по ширине листа (“лежачая” палисадная ткань). Губчатая ткань рыхлая и состоит из разветвленных клеток, вытянутых по ширине листа. В отдельных клетках мезофилла видны пучки тонких рафид и крупные игольчатые кристаллы (стилоиды) оксалата кальция.

Цветки. Эпидермис венчика с обеих сторон состоит из клеток с ровными тонкими стенками многоугольной формы. Кутикула продольно-морщинистая. Устьица погруженные, округлые, ориентированы по длине околоцветника, окружены 4 – 5 клетками эпидермиса (тетра- и пентацитный тип). Эпидермис зубчика с сосочковидными выростами, по краю с одноклеточными бахромчатыми волосками. В ткани околоцветника присутствуют идиобласты, содержащие слизь и тонкие рафиды кальция оксалата, встречаются крупные игольчатые кристаллы – стилоиды.Пыльца шаровидной формы с гладкой поверхностью.

Эпидермис цветоноса состоит из клеток прямоугольной и прямоугольно-веретеновидной формы с прямыми стенками и ровной кутикулой. Устьица тетрацитноготипа. Идиобласты, рафиды и стилоиды такие же, как в околоцветнике.



Рисунок– Ландыша листья, ландыша цветки.
1 –фрагмент листа с рафидами (а) и игольчатыми кристаллами (б) (250×); 2 – фрагмент эпидермиса цветоносас рафидами (а) и устьицами тетрацитного типа (б) (125×); 3 – фрагмент верхнего эпидермиса лепестка со складчатой кутикулой (а) и устьицами тетрацитного типа (б) (200×); 4 – фрагмент лепестка с сосочковидными выростами (а) и пыльцой (б)(125×).

Определение основных групп биологически активных веществ

1. Тонкослойная хроматография

Около 2,0 г листьев, травы или цветков ландыша, измельченных до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещают в круглодонную колбу и прибавляют 60 мл спирта 70 %. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане в течение 1 ч, после охлаждения извлечение фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл.К шроту прибавляют 40 мл спирта 70 %, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на

водяной бане в течение 30 мин, после охлаждения раствор фильтруют в ту же мерную колбу, объем раствора доводят тем же спиртом до метки и перемешивают. 10 мл раствора упаривают на водяной бане, сухой остаток растворяют в 3 млспирта 70 %. Объем раствора доводят водой до 10 мл, прибавляют 1 мл свинца (II)ацетата раствора 10 % и перемешивают (раствор А).

Полученный растворАфильтруют в делительную воронку через бумажный фильтр, предварительно смоченный водой. Фильтр промывают 5 мл воды, прибавляют 30 мл смеси хлороформ – спирт 96 % (8:2) и извлекают в течение 5 мин. После разделения слоев хлороформный нижний слой фильтруют через бумажный фильтр, содержащий 3 г натрия сульфата безводного, смоченного 5 мл хлороформно-спиртовой смеси, в фарфоровую чашку. Операцию извлечения хлороформно-спиртовой смесью повторяют еще дважды, используя по 25 мл этой смеси. Хлороформное извлечение фильтруют через тот же фильтр в ту же фарфоровую чашку, фильтр промывают 10 мл хлороформно-спиртовой смеси (8:2). Объединенное хлороформное извлечение выпаривают на водяной бане досуха. Сухой остаток растворяют 2 мл спирта 70 % (раствор Б).

На линию стартааналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 50 мкл раствора Б. Пластинку с нанесенной пробой сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 1 ч смесью растворителей хлороформ – ацетон–метанол (6:2:2), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей. Пластинку обрабатывают ванилина раствором 1 % в хлорной кислоте разведенной 10 %и выдерживают в сушильном шкафу при температуре 80-85 °С до четкого обнаружения зон.

На хроматограмме раствора Б должны обнаруживаться не менее 3 зон адсорбции малинового цвета; допускается обнаружение других зон адсорбции (гликозиды).

2. Качественные реакции

К 3 мл элюата (см. раздел «Количественное определение»), прибавляют 2,5 мл натрия пикрата нейтрального раствора и 0,5 мл натрия гидроксидараствора 2 %, через 10 мин появляется оранжево-желтое окрашивание (гликозиды).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность.*Цельное сырье,трава,листья* –не более 14 %.*Цельное сырье,цветки* –не более 12 %.*Измельченное сырье,трава,листья*–не более 14 %.

Измельченность сырья.*Цельное сырье,трава* –частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером3 мм, –не более 3 %.*Цельное сырье, листья* – частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, –не более 3 %. *Измельченное сырье,трава*– частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, –не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, –не более 5 %. *Измельченное сырье,листья*– частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером7 мм, –не более 5%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм,– не более 5 %.

Посторонние примеси

Соцветия.*Цельное сырье, измельченное сырье. Трава*–не менее 5 %.

Сырье, изменившее окраску.*Цельное сырье. Трава, листья, цветки*–не более 5%.*Измельченное сырье. Трава, листья*–не более 5 %.

Отдельные цветоносы.*Цельное сырье. Цветки*– не более 1 %.

Органическая примесь.*Цельное сырье. Трава, листья*–не более 1 %.*Цельное сырье. Цветки* –не более 0,5 %.*Измельченное сырье. Трава, листья*–не более 1 %.

Минеральная примесь.*Цельное сырье. Трава, листья*–не более 0,5 %.*Цельное сырье. Цветки* –не более 0,3 %. *Измельченное сырье. Трава, листья*–не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС

«Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье,трава.* Биологическая активность 1 г должна быть не менее 110 ЛЕД и не более 120 ЛЕД.*Цельное сырье,листья*. Биологическая активность 1 г должна быть не менее 80 ЛЕД и не более 90 ЛЕД.*Цельное сырье,цветки*. Биологическая активность 1 г должна быть не менее 190 ЛЕД и не более 200 ЛЕД. *Измельченное сырье,трава.* Биологическая активность 1 г должна быть не менее 110 ЛЕД и не более 120 ЛЕД. *Измельченное сырье,листья*. Биологическая активность 1 г должна быть не менее 80 ЛЕД и не более 90 ЛЕД.

Биологическая активность. Активность цветков, травы и листьев ландыша определяют биологическим методом на лягушках по сравнению со стандартным образцом (СО) ландышаэкстракта в соответствии с требованиями ОФС «Биологические методы оценки активности лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов, содержащих сердечные гликозиды».

Испытание на лягушках. Испытание проводят на травяных лягушках, вводя растворы в лимфатические бедренные мешки (под кожу) или в сердце (в полость желудочка), или на водяных лягушках, вводя раствор под кожу, в полость желудочка или в вену. Стандартный и испытуемый образцы готовят в день опыта.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, и сушат в сушильном шкафу в течение 2 ч при температуре 40 – 60 °С; 5,0 г (точная навеска) высушенного сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито

с отверстиями размером1 мм, и экстрагируют110 мл спирта 96 % в аппарате Сокслета в течение 6 – 8 ч. Извлечение собирают в цилиндр вместимостью 100 мл и доводят объем спиртом 96 % до метки (1:20).

Для подкожного введения к 2 мл СО экстракта ландыша прибавляют 6 мл воды (1:4).

Спирто-водное извлечение (1:20) переводят в спирто-водное в соотношении 1:30 (листья), 1:40 (трава), 1:60 (цветки). Для этого 20 мл спирто-водного извлечения (1:20) выпаривают на водяной бане до 2 мл и доводят объем до 30 мл (листья); 40 мл (трава) и 60 мл (цветки) водой.

Образующуюся при этом муть или осадок не отфильтровывают, а прибавляют 1–2 капли натрия гидрокарбонатараствора 5 %. Полученное таким образом спирто-водное извлечение (1:20) испытывают на лягушках.

Определив наименьшие дозы стандартного и испытуемого образцов (в мл на массу травяной лягушки или в мл на 1 г массы водяной лягушки), вычисляют содержание ЛЕД в 1 г сырья.

Примечание. В случае завышенной биологической активности сырья (по числу ЛЕД) расчет количества лекарственного растительного сырья необходимого для производства лекарственного препарата следует проводить по формуле, приведенной в ОФС «Лекарственное растительное сырье. Фармацевтические субстанции растительного происхождения».

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Лапчатки прямостоячей корневища **ФС.2.5.0023.15**

Potentillae erectae rhizomata

Собранныев фазу цветения(или осенью или весной до появления прикорневых листьев), очищенные от корней и отмытые от земли,высушенные корневища дикорастущего и культивируемого многолетнего травянистого растения лапчатки прямостоячей – *Potentilla erecta* L. Raeusch.– (syn.*Potentilla tormentilla* Stokes.*),* сем.розоцветных – *Rosaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки.*Цельное сырье.*Цельные или разрезанные на кускикорневища длиной от 2 до 9 см, толщиной не менее 0,5 см, прямые или изогнутые, часто неопределенной формы (цилиндрические или почти шаровидные, комковатые); твердые, тяжелые, с ямчатыми следами от отрезанных корней и бугристыми рубцами от стеблей. Излом зернистый.

Цвет снаружи от красновато-коричневого до темно-коричневого (почти черного), цвет на изломе желтовато-коричневый, розовато-коричневый или коричневый. На поперечном разрезе под лупой виден слой пробки темно-коричневого цвета, светло-желтая кора и древесина, и сердцевина розоватого цвета. Запах слабый, характерный.Вкус водного извлечения вяжущий.

*Измельченное сырье.*При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки корневищ неопределенной формы с бугристой наружной поверхностью и мелкозернистым изломом, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет от желтовато-коричневого, розовато-коричневого до темно-

коричневого. Встречаются кусочки с остатками мелких корней и следами их прикрепления; редко – кусочки тонких корней. Наружная поверхность от красновато-коричневого до темно-коричневого (почти черного) цвета; излом желтовато-, розовато- или темно-коричневого цвета. Запах слабый, характерный.Вкус водного извлечения вяжущий.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении поперечного среза корневища должно быть видно его непучковое строение. Покровная ткань – пробка, состоит из прямостенныхтаблитчато расположенных тонкостенных клеток темно-коричневого цвета. Под пробкой находится коровая паренхима, клетки которой округлые или слегка сдавлены в тангенальномнаправлении. Паренхима флоэмы представлена мелкими тонкостенными клетками. Механические ткани в коре отсутствуют. Линия камбия не всегда четко выражена. Древесина рассеяно сосудистого типа. Сосуды немногочисленные, широкие, в поперечном сечении округлые или радиально овальные, одиночные или в небольших радиальных группах по 2–3 (до 8). Сосуды прилегают к либриформу, образующему радиальные ряды. Волокна расположены прерывистыми радиальными полосками концентрическими кругами. Между радиальными рядами проводящей и механической ткани проходят широкие сердцевинные лучи из тонкостенной паренхимы. Сердцевина состоит из крупноклеточной тонкостенной паренхимы.

В коровой паренхиме, во флоэме, сердцевинных лучах и сердцевине содержатся включения в виде крахмальных зерен и друз оксалата кальция. Иногда клетки полностью заполнены крахмальными зернами. Крахмальные зерна мелкие.

*Измельченное сырье.*При рассмотрении «давленых» препаратов должны быть видны: фрагменты пробки темно-коричневого цвета, состоящей из прямостенныхтаблитчатораспоженных тонкостенных клеток; фрагменты паренхимы, состоящие из округлых или слегка удлиненных тонкостенных клеток с друзами оксалата кальция и крахмальными зернами;

фрагменты сосудов ксилемы различной толщины с лестничным и сетчатым типом вторичного утолщения клеточных стенок; группы толстостенных узкополосных пористых волокон или их фрагменты.

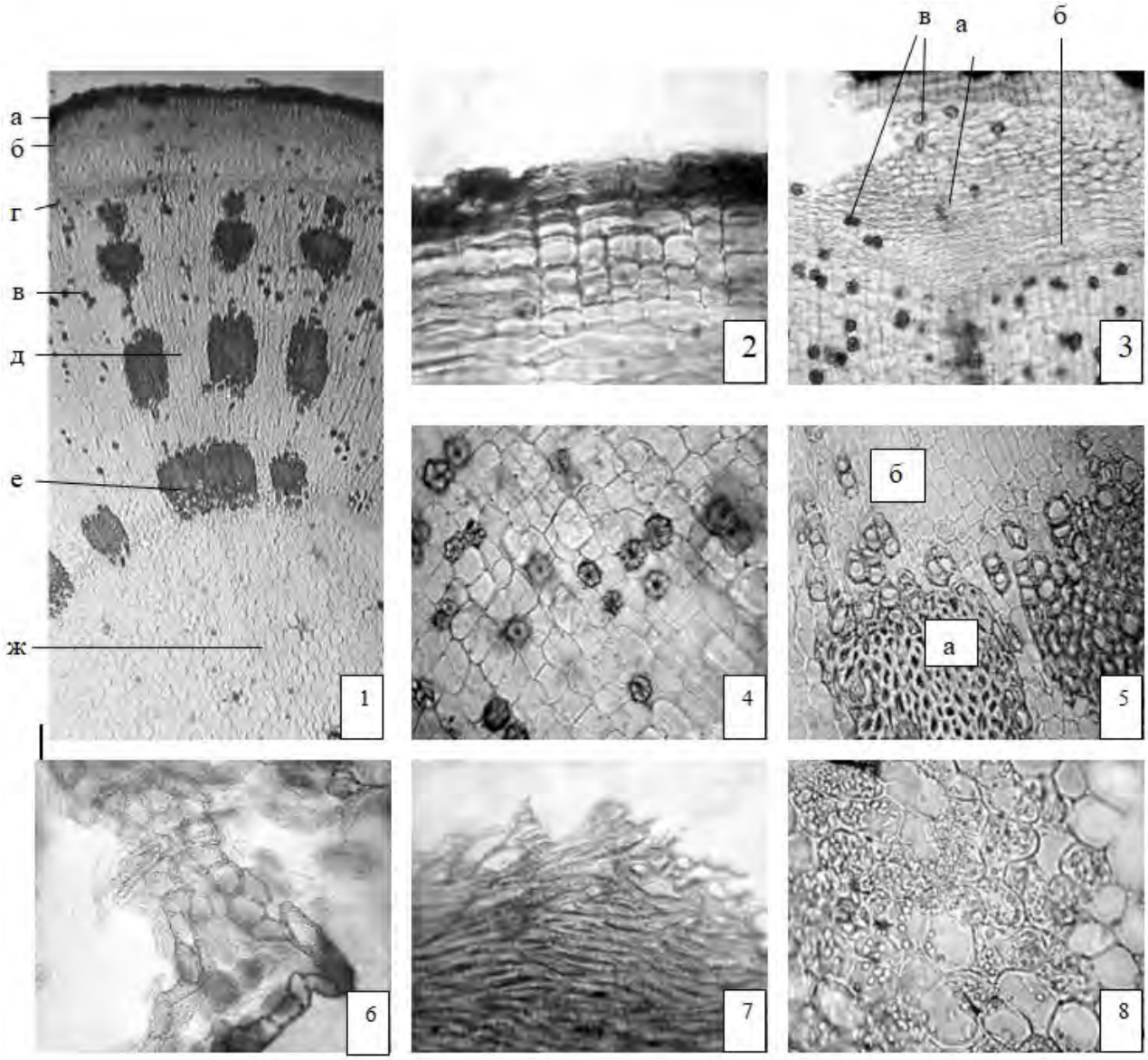


Рисунок –Лапчатки корневища.

1 – фрагмент поперечного срезалапчатки корневища: пробка (а), кора (б), друзы (в), камбий (г), сердцевинный луч (д), ксилема (е), клетки паренхимы сердцевины с крахмальными зернами (ж) (35×); 2 – фрагмент пробки (600×); 3 – фрагмент поперечного среза: флоэма (луб) (а), камбий (б), друзы оксалата кальция (в) (120×); 4 – клетки паренхимы коры с друзами оксалата кальция (300×); 5 – фрагмент поперечного среза: либриформ (а), сосуды ксилемы (б) (300×); 6 – обрывки сосудов ксилемы (300×); 7 – обрывки волокон (либриформ) (300×); 8 – клетки паренхимы с крахмальными зернами (300×).

Определение основных групп биологически активных веществ

1. ***Тонкослойная хроматография***

*Раствор стандартного образца (СО) галловой кислоты.*Около 0,05 г СО галловой кислоты растворяют в 50 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности растворане более 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около 0,5 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, помещают в круглодонную колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 5 мл спирта 50 %, нагревают на водяной бане с обратным холодильником в течение 10 мин. После охлаждения до комнатной температуры полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр в колбу вместимостью 25 мл. Экстракцию повторяют еще раз, извлечение фильтруют в ту же колбу вместимостью 25 мл (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 10 мкл испытуемого раствора и 2 мкл раствора СО галловой кислоты. Пластинку с нанесенными пробами, сушат при комнатной температуре в течение 5 мин, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 40 мин смесью растворителей этилацетат – толуол –муравьиная кислота безводная – вода (30:10:5:2) и хроматографируют восходящим способом.

Когда фронт подвижной фазы пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, пластинку вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей под тягой при комнатной температуре.

Затем хроматограмму обрабатывают железа(III) хлорида спиртовым раствором 1 %, сушат под тягой при комнатной температуре в течение 3 – 5 мин и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме СО галловой кислоты должна обнаруживаться зона адсорбции темно-синего цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться не менее двух зон адсорбции коричневого или сине-коричневого цвета, одна из которых на уровне зоны адсорбции СО галловой кислоты, а другая ниже нее; допускается обнаружение других зон (дубильные вещества).

2. Качественные реакции

К 2 – 3 мл отвара корневищ лапчатки (1:10) прибавляют 4 – 5 капель железа(III) аммония сульфата раствора 1 %, должно наблюдаться зеленовато-черное окрашивание, постепенно переходящее в черно-синее (дубильные вещества).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность.*Цельное сырье,измельченное сырье*– не более 14 %.

Зола общая.*Цельное сырье,измельченное сырье*– не более 5 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте.*Цельное сырье,измельченное сырье*– не более 3 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, –не более 5 %. *Измельченное сырье:*частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, –не более

5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, –не более 5 %.

Посторонние примеси

Корневища, потемневшие в изломе.*Цельное сырье,измельченное сырье* – не более 5 %.

Кусочки корней, листьев, стеблей.*Цельное сырье,измельченное сырье* – не более 1 %.

Органическая примесь.*Цельное сырье,измельченное сырье* – не более 0,5 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье,измельченное сырье*– не более 1 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье:*дубильные вещества в пересчете на танин –не менее 20 %.

Определение дубильных проводятвеществ в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1).

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Лимонника китайского плоды **ФС.2.5.0081.18**

Взамен ГФ X, ст. 294

Schisandrae chinensis fructus

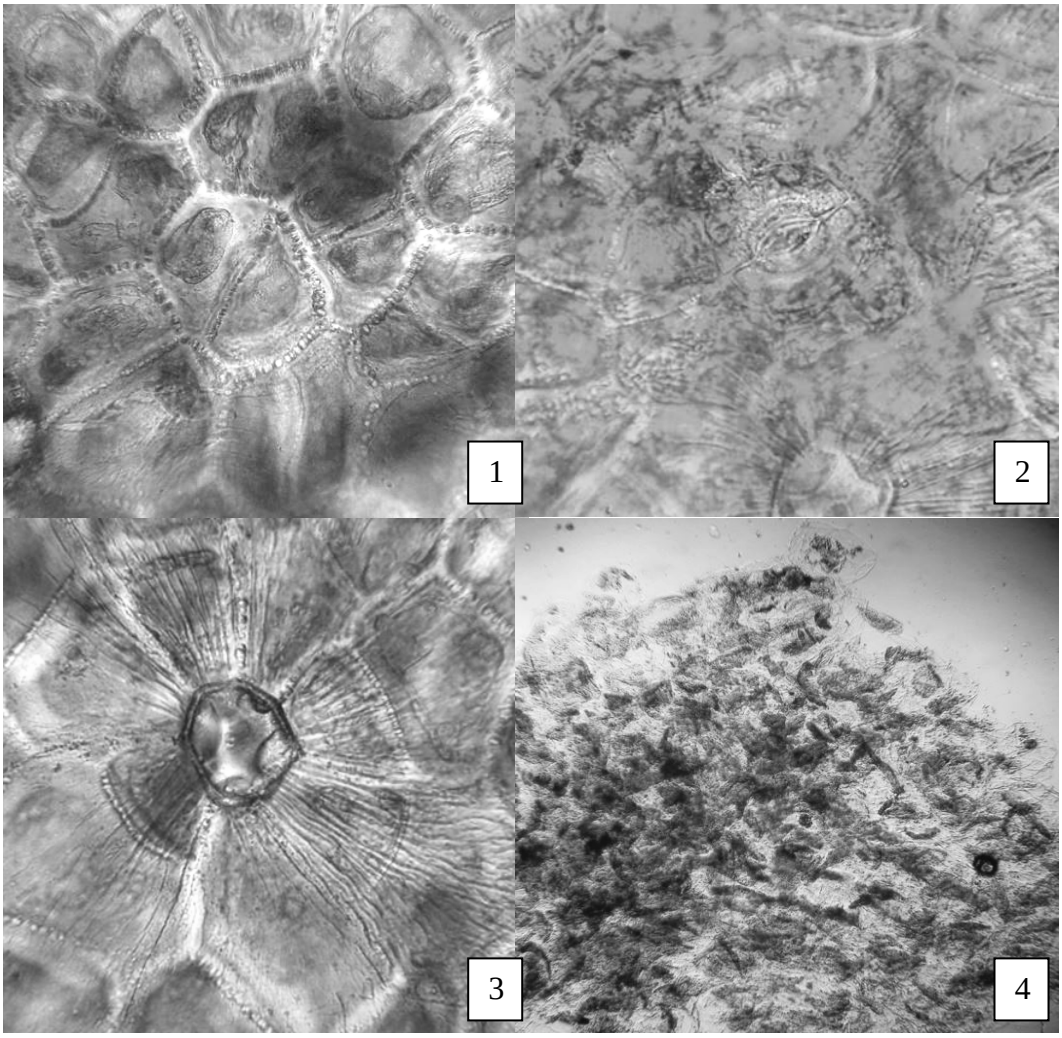
Собранные в период полного созревания (в сентябре – октябре), до наступления осенних заморозков, высушенные плоды дикорастущей или культивируемой деревянистой лианы лимонника китайского – *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. из сем. лимонниковых – *Schisandraceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Плоды округлой формы, часто деформированные, крупно морщинистые, одиночные (5–7 мм в диаметре) или слипшиеся по нескольку вместе. В мякоти плода 1–2 блестящих, округло-почковидных, желтовато-бурых или светло коричневых семени. Цвет плодов от темно-красного до почти черного. Запах слабый, специфический. Вкус водного извлечения пряный, горьковато-кислый с терпким привкусом и характерным жжением во рту.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении наружного слоя перикарпия с поверхности видны многоугольные прямостенные клетки эпидермиса со слегка утолщенными стенками и складчатой кутикулой. Имеется достаточно много округлых секреторных клеток с каплями эфирного масла, клетки эпидермиса вокруг них образуют розетку. Изредка встречаются устьица аномоцитного типа. Внутренняя часть перикарпия – мякоть плода – состоит из тонкостенных, рыхло расположенных бесцветных и окрашенных паренхимных клеток. На поперечном срезе семени видна семенная кожура, состоящая из нескольких слоев: эпидермальный слой представлен крупными радиально вытянутыми клетками, с утолщенными одревесневшими темно-желтыми оболочками,

пронизанными порами. Под ним расположен склеренхимный слой, состоящий из 4-6 рядов сильно одревесневших каменистых клеток. Далее лежит слой спавшихся клеток, а за ним один ряд очень крупных тонкостенных 4-угольных клеток, содержащих маслянистые включения в виде капель лимонно-желтого цвета. Самый внутренний слой семенной кожуры – бесструктурная спавшаяся тонкостенная ткань. Эндосперм семени состоит из небольших многоугольных клеток, содержащих капли жирного масла и мелкие алейроновые зерна.



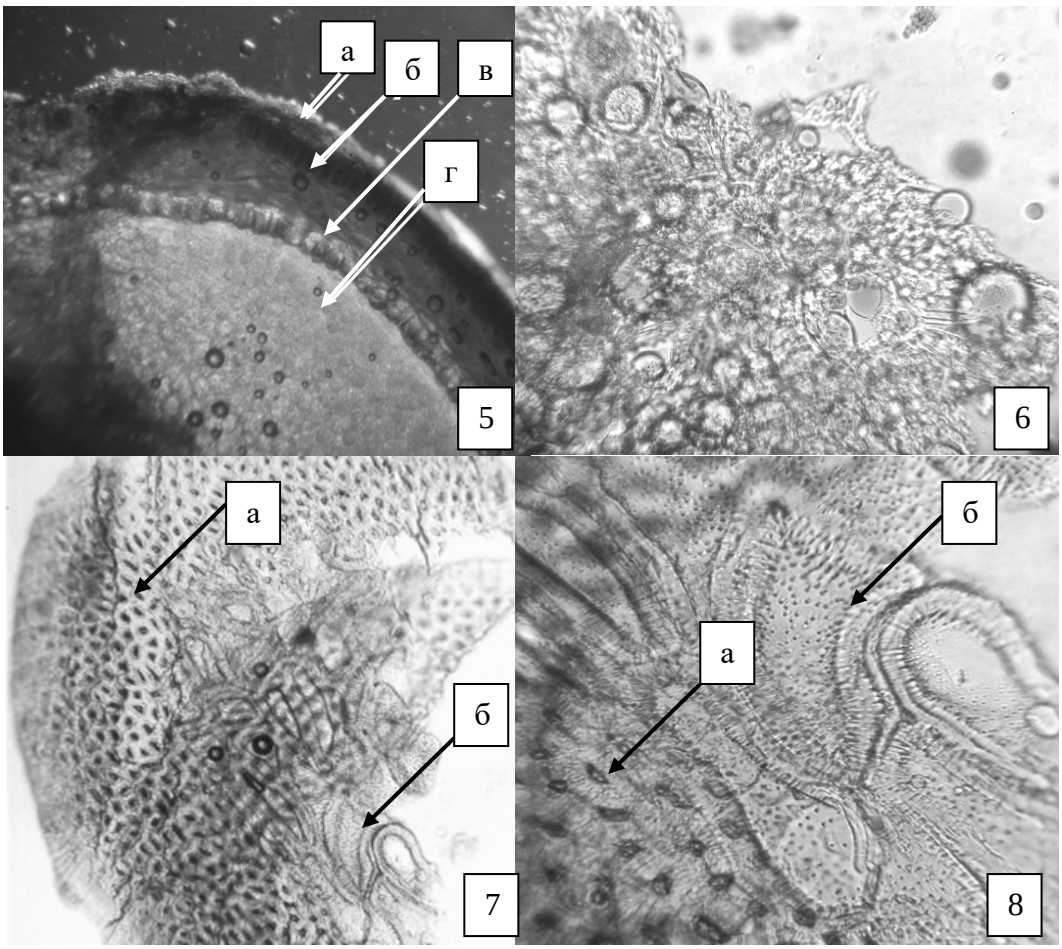


Рисунок – Лимонника китайского плоды

1 – препарат околоплодника с поверхности: прямостенные клетки эпидермиса (×400); 2 – препарат околоплодника с поверхности: устьице (× 400); 3 – препарат околоплодника с поверхности: секреторные клетки, окруженные розетками клеток эпидермиса, складчатая кутикула (×400);
4 – мякоть плода (×100); 5 – фрагмент поперечного среза семени: семенная кожура со слоями эпидермиса (а) и механических клеток (б), слоем клеток с каплями масла лимонно – жёлтого цвета (в) и эндоспермом (г) (×100);
6 – эндосперм с каплями жирного масла (препарат в судане III) (х400);
7 – клетки эпидермиса (а) и механические клетки (б) наружных слоев семенной кожуры (×100); 8 – клетки эпидермиса (а) и механические клетки (б) наружных слоев семенной кожуры (×400).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Около 0,5 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 25 мл спирта 70 %, нагревают на кипящей

водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин. После охлажденния до комнатной температуры полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 10 мкл (0,01 мл) испытуемого раствора в виде полосы длиной 10 мм, шириной не более 3 мм.

Пластинку с нанесенной пробой сушат на воздухе в течение 2-3 мин, затем помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 30 мин смесью растворителей толуол – этилацетат – кислота уксусная (70:33:3), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, и просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться не менее 6 зон адсорбции фиолетового цвета.

Качественная реакция

Около 0,25 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 25 мл спирта этилового 95 %. Колбу соединяют с обратным холодильником и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Охлажденное до комнатной температуры извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

2 мл испытуемого раствора упаривают досуха, к остатку прибавляют 2 мл трихлорметана и 3–5 капель кислоты серной концентрированной, встряхивают; должно наблюдаться окрашивание красно-коричневого цвета (лигнаны).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье* – не более 12 %.

Зола общая. *Цельное сырье* – не более 6 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье* – не более 1,5 %.

Посторонние примеси

Плоды подгоревшие и поврежденные. *Цельное сырье* – не более 4 %.

Другие части лимонника (остатки цветоложа, веточки). *Цельное сырье* – не более 1%.

Органическая примесь. *Цельное сырье* – не более 0,5 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье* – не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье:* суммы лигнанов в пересчете на схизандрин – не менее 0,7 %.

Приготовление растворов

Раствор стандартного образца (СО) дифенила. Около 0,025 г (точная навеска) СО дифенила помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 20 мл спирта 70 % и перемешивают. Затем доводят объем раствора спиртом 70 % (раствор А СО дифенила). 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят до метки спиртом 70 % (раствор Б СО дифенила). Раствор используют свежеприготовленным.

Проверка пригодности хроматографической системы.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику дифенила, должна быть не менее 5000 теоретических тарелок.

- относительное стандартное отклонение площади пика дифенила на пяти хроматограммах не должна превышать 3 %;

- фактор асимметрии пика дифенила должен быть не более 1,5 %.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл спирта 70 %. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 1,5 час. После охлаждения фильтруют в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят до метки спиртом 70 % (раствор А испытуемого раствора).

10,0 мл раствора А испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят спиртом 70 % до метки (раствор Б испытуемого раствора).

Условия хроматографирования

Колонка	250 × 4,6 мм, эндкеппированный октадецилсилил (C_{18}) силикагель для хроматографии, 5 мкм
Подвижная фаза	ацетонитрил – вода (80 : 20)
Скорость потока, мл/мин	1
Температура колонки, ^{o}C	комнатная (20 ± 2)
Детектор	диодная матрица или спектрофотометрический; длина волны 248 нм
Объем вводимой пробы, мкл	20
Время хроматографирования, мин	30

Хроматографируют раствор Б СО дифенила, получая не менее 3 хроматограмм. Результаты считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Хроматографируют попеременно раствор Б испытуемого раствора и

раствор Б СО дифенила, получая не менее 3 хроматограмм. Расчет содержания дифенила, проводят методом внешнего стандарта.

Содержание лигнанов в пересчете на схизандрин в абсолютно сухом сырье в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_x \cdot a_o \cdot 25 \cdot k \cdot 100 \cdot 100}{S_o \cdot a \cdot 25 \cdot 10 \cdot (100 - W)} = \frac{S_x \cdot a_o \cdot 1{,}89 \cdot 100 \cdot 100}{S_o \cdot a \cdot 10 \cdot (100 - W)},$$

где a_0 – навеска СО дифенила, г;

a – навеска сырья, г;

k – коэффициент пересчёта на схизандрин, k = 1,89;

S_o – площадь пика на хроматограмме раствора Б СО дифенила;

S_x – суммарная площадь пиков на хроматограмме раствора Б испытуемого раствора, в интервале времён удерживания от 0,3 до 2,3 от времени удерживания пика дифенила;

W – влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Лимонника китайского семена	**ФС.2.5.0082.18**
Schisandrae chinensidis semina	**Взамен ГФ XI ст. 80**

Собранные и освобожденные от околоплодника, высушенные семена дикорастущей деревянистой лианы лимонника китайского – *Schisandra chinensis (Turcz.) Baill.,* сем. лимонниковых – *Schisandraceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Семена округло-почковидной формы, на вогнутой стороне с заметным темно-серым рубчиком, расположенным поперек семени. Длина 3 - 5 мм, ширина 2 - 4,5 мм, толщина 1,5 - 2,5 мм. Поверхность гладкая, блестящая, желтовато-бурого цвета. Семена состоят из твердой хрупкой кожуры и плотного ядра, которое у недоразвитых семян может отсутствовать. Кожура легко ломается и свободно отстает от ядра. Ядро подковообразной формы, восковидно-желтое, один конец конусовидно заостренный, другой округлый. На выпуклой стороне ядра семени проходит светло-коричневая бороздка. Основную массу ядра семени составляет эндосперм. В заостренном конце верхушки (в эндосперме) лежит небольшой зародыш, заметный под лупой. Цвет желтовато-коричневый. Запах сильный, характерный. Вкус водного извлечения пряный, горьковато-жгучий.

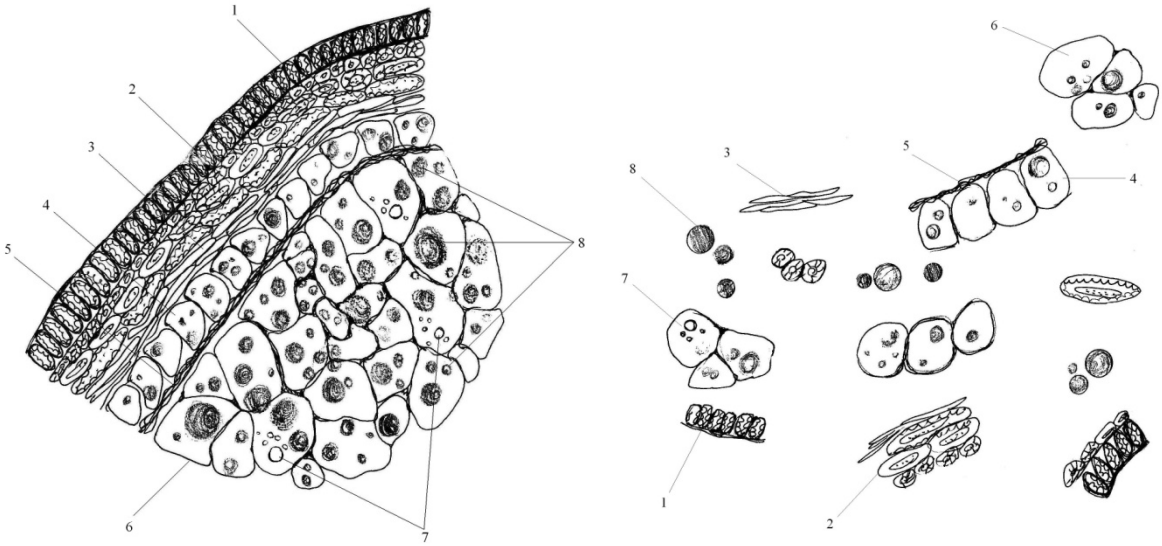
Измельченное сырье. Кусочки сырья различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями диаметром 5 мм. Цвет желтовато-коричневый. Запах сильный, характерный. Вкус водного извлечения пряный, горьковато-жгучий.

Микроскопические признаки *Цельное сырье.* На поперечном срезе семени должна быть видна семенная кожура, состоящая из нескольких слоев.

Эпидермальный слой представлен крупными радиально вытянутыми клетками, с утолщенными, одревесневшими темно-желтыми оболочками, пронизанными порами. Под ним расположен склеренхимный слой, состоящий из 4-6 рядов сильно одревесневших каменистых клеток.

Далее лежит слой спавшихся клеток, а за ним один ряд очень крупных тонкостенных 4-угольных клеток, содержащих маслянистые включения в виде капель лимонно-желтого цвета. Самый внутренний слой семенной кожуры – бесструктурная спавшаяся тонкостенная ткань. Эндосперм семени состоит из небольших многоугольных клеток, содержащих капли жирного масла и мелкие алейроновые зерна.

Измельченное сырье. При рассмотрении микропрепаратов измельченного сырья должны быть видны фрагменты семенной кожуры с крупными радиально вытянутыми клетками эпидермального слоя, фрагменты склеренхимы и отдельные каменистые клетки, фрагменты спавшихся клеток, эндосперма с каплями масла, алейроновые зерна, капли масла.



А Б

Рисунок 1 – Лимонника китайского семена (120×)
А – поперечный срез; Б – измельченное сырье: 1 – эпидермис; 2 – склеренхима; 3 – слой спавшихся клеток; 4 – клетки с каплями масла лимонно – жёлтого цвета; 5 – бесструктурная спавшаяся тонкостенная ткань; 6 – клетки эндосперма; 7 – алейроновые зёрна; 8 – капли масла.

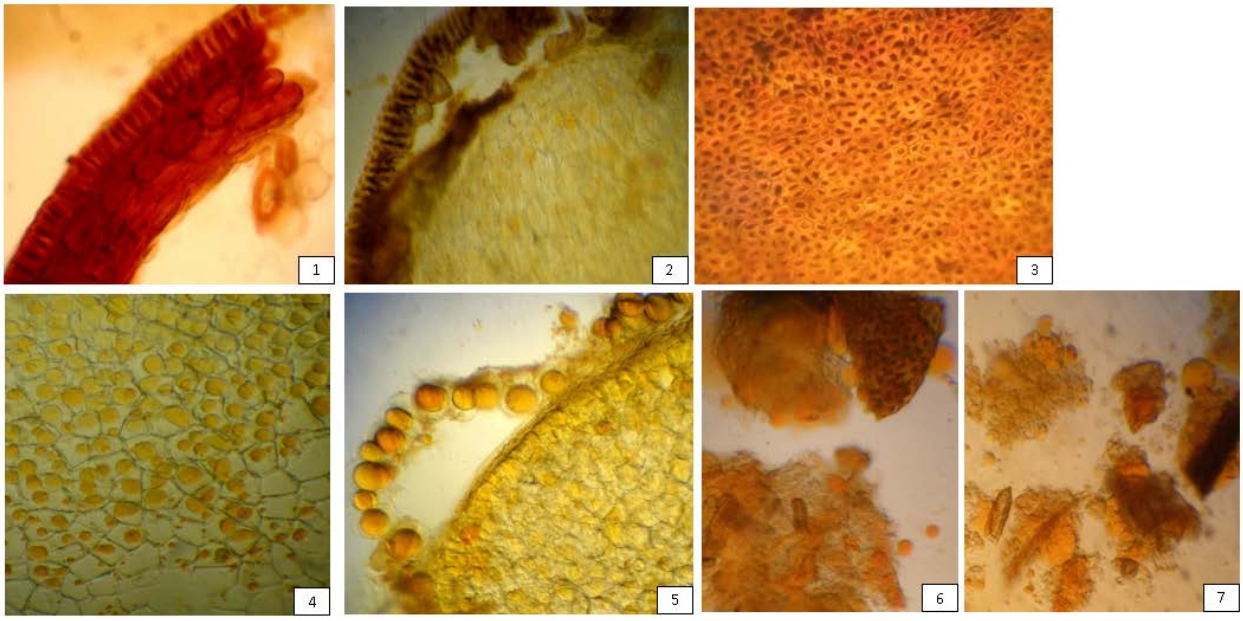


Рисунок 2 – Лимонника китайского семена.
1 – поперечный срез семенной кожуры (120×); 2 – поперечный срез семени (120×); 3 – семенная кожура с поверхности (120×); 4 – поперечный срез семени. Эндосперм (120×); 5 – поперечный срез семени. Слой клеток с каплями жирного масла и эндосперм (120×); 6, 7 – Лимонника китайского семена измельченные (120×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Около 0,5 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 25 мл спирта 70 %, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Охлажденное до комнатной температуры извлечение фильтруют через бумажный фильтр «белая лента» (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором наносят 10 мкл (0,01 мл) испытуемого раствора. Пластинку с нанесенной пробой сушат на воздухе в течение 2 – 3 мин, затем помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 30 мин хлороформом, и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пла-

стинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителя и просматривают в УФ –свете при длине волны 254 нм.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться одна основная зона адсорбции фиолетового цвета и не менее 3 зон адсорбции фиолетового цвета: одна выше и две ниже основной зоны адсорбции.

Качественная реакция

0,5 г сырья экстрагируют 25 мл спирта 70 % в течение 30 мин. Полученное извлечение после охлаждения упаривают на кипящей водяной бане досуха. К сухому остатку добавляют 2 мл хлористого метилена и 3 – 5 капель серной кислоты концентрированной; должно наблюдаться красно – коричневое окрашивание (лигнаны).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 12 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 0,5 %.

Измельченность сырья. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм, - не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, - не более 5 %.

Посторонние примеси

Поврежденные семена. *Цельное сырье* - не более 5 %.

Другие части растения. *Цельное сырье* - не более 3 %.

Органическая примесь*. Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье* - содержание суммы лигнанов в пересчёте на схизандрин не менее 1 %.

Приготовление растворов

Раствор стандартного образца (СО) дифенила. Около 0,025 г (точная навеска) СО дифенила растворяют в спирте 70 % в мерной колбе вместимостью 25 мл, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (раствор А СО дифенила). Срок годности раствора 7 суток.

1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивают (раствор Б СО дифенила). Раствор используют свежеприготовленным.

Проверка пригодности хроматографической системы.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику дифенила на хроматограмме раствора Б СО дифенила, должна быть не менее 5000 теоретических тарелок;
- относительное стандартное отклонение площади пика дифенила на пяти хроматограммах не должна превышать 3 %;
- фактор асимметрии пика дифенила должен быть не менее 0,8 и не более 1,5 %.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл спирта 70 %, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 45 мин. Полученное извлечение охлаждают до комнатной температуры и фильтруют в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивают (раствор А испытуемого раствора).

10,0 мл раствора А испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора).

Условия хроматографирования

Колонка	250 × 4,6 мм, эндкеппированный октадецилсилил (C_{18}) силикагель для хроматографии, 5 мкм;
Подвижная фаза	ацетонитрил – вода (80 : 20);
Скорость потока, мл/мин	1,0;
Температура колонки, °С	(20 ± 2);
Детектор	диодная матрица/УФ-спектрофотометрический;
Длина волны, нм	248;
Объем вводимой пробы, мкл	20;
Время хроматографирования, мин.	30

Хроматографируют раствор Б СО дифенила, получая не менее 5 хроматограмм. Результаты считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Хроматографируют попеременно раствор Б испытуемого раствора и раствор Б СО дифенила, получая не менее 3 хроматограмм. Расчет содержания суммы лигнанов проводят по методу внешнего стандарта.

Содержание суммы лигнанов в пересчете на схизандрин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_x \cdot a_o \cdot 1 \cdot 50 \cdot 25 \cdot k \cdot 100 \cdot 100}{S_o \cdot a \cdot 25 \cdot 25 \cdot 10 \cdot (100 - W)} = \frac{S_x \cdot a_o \cdot 3780}{S_o \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где a – навеска сырья, г;

a_o – навеска СО дифенила, г;

k – коффициент пересчёта на схизандрин, k = 1,89;

S_o – площадь пика на хроматограмме раствора Б СО дифенила;

S_x – суммарная площадь пиков на хроматограмме раствора Б испытуемого раствора с относительными временами удерживания (по дифенилу) в интервале от 0,3 до 2,3;

W – влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Липы цветки **ФС.2.5.0024.15**

Tiliae flores

Собранные во время цветения и высушенные соцветия дикорастущих и культивируемых деревьев липы сердцевидной – *Tilia cordata* Mill. и липы широколистной – *Tilia platyphyllos* Scop., сем.липовых– *Tiliaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.*Соцветия щитковидные, состоят из 5–15 (у липы сердцевидной) или 2–9 (у липы широколистной) цветков на удлиненных цветоножках, сидящих на общем цветоносе, сросшемся в нижней части с главной жилкой прицветного листа. Цветки правильные, 1–1,5 см в диаметре. Чашечка из 5 продолговато-яйцевидных чашелистиков, густо опушенных по краю и с внутренней стороны. Венчик из 5 свободных яйцевидных лепестков, длиннее чашечки. Тычинки многочисленные, с 2 желтыми пыльниками на длинных нитях, сросшихся в 5 пучков. Пестик один с верхней шаровидной завязью, густо покрытой пушистыми волосками. Встречаются цветочные бутоны и незрелые плоды – шаровидные сильно опушенные орешки до 2 мм в диаметре. Прицветный лист пленчатый, с густой сетью жилок, длиной до 6 см и шириной до 1,5 см, продолговато-эллиптической формы с притупленной верхушкой, в нижней половине сросшийся по главной жилке с цветоносом.Цвет лепестков беловато-желтый, чашелистиков зеленовато- или желтовато-серый, прицветных листьев светло-желтый или зеленовато-желтый. Запах слабый, характерный. Вкус водного извлечения сладковатый, слегка вяжущий, с ощущением слизистости.

Измельченное сырье. Смесь цветков,цветоножек и кусочков прицветников различной формы, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.

При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) виднысусочки слегка опушенных прицветных листьев светло-желтого, зеленовато-желтого или светло-зеленого цвета; чашелистики или их части, густо опушенные (с внутренней стороны и по краю), желто-серого, зеленовато-серого, реже светло-коричневого цвета; лепестки яйцевидной формы бело-желтого цвета; тычинки, пестик или их части, опушенные, светло-желтого цвета; кусочки цветоножек и цветоносов, опушенные, светло-зеленого, зеленого или серо-зеленого цвета; отдельные цветочные бутоны и незрелые сильноопушенные плоды (орешки) светло-зеленого или серо-зеленого цвета.

Цвет измельченного сырья лепестков беловато-желтый, чашелистиков зеленовато- или желтовато-серый, светло-коричневый, прицветных листьев – светло-желтый или зеленовато-желтый, светло-зеленый.Запах слабый, характерный. Вкус водного извлечения сладковатый, слегка вяжущий, с ощущением слизистости.

Порошок. Смесь частиц цветков, цветоножек и прицветников липы различной формы, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

При рассмотрении порошка под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны: кусочки слегка опушенных прицветных листьев зеленого, светло-зеленого или зелено-желтого цвета; чашелистики или их части, густо опушенные (с внутренней стороны и по краю), желто-серого, зеленовато-серого, реже светло-коричневого цвета; лепестки яйцевидной формы бело-желтого цвета; тычинки, пестик или их части, опушенные, светло-желтого цвета; кусочки цветоножек и цветоносов, опушенные, светло-зеленого, зеленого или серо-зеленого цвета; отдельные цветочные бутоны и незрелые сильноопушенные плоды (орешки) светло-зеленого или серо-зеленого цвета.

Цвет порошка серовато-зеленый, серовато-желтый или светло-

коричневый с желтыми, темно-желтыми, коричневыми и темно-коричневыми вкраплениями. Запах слабый, характерный. Вкус водного извлечения сладковатый, слегка вяжущий, с ощущением слизистости.

Микроскопические признаки.*Цельноесырье, измельченное сырье.*При рассмотрении прицветного листа с поверхности с обеих сторон листа видны сильноизвилистые стенки клеток эпидермиса. Кутикула продольно-морщинистая с обеих сторон. Морщинистость очень сильно выраженная. Устьица только на нижней стороне, овальные, с 4–6 околоустьичными клетками (аномоцитный тип). Жилки сопровождаются вытянутыми клетками с утолщенными слабоизвилистыми стенками. Вдоль жилок пролегают секреторные ходы, наполненные розовым содержимым. Волоски встречаются преимущественно в средней части прицветного листа, вблизи места срастания его с цветоносом. Волоски 2 типов: головчатые – с многоклеточной овальной головкой на короткой 1–3-клеточной ножке и звездчатые, состоящие из 3–7 длинных извилистых клеток, сросшихся основаниями. Мезофилл очень рыхлый, типа аэренхимы, с друзами, реже с призматическими кристаллами оксалата кальция, особенно многочисленными вблизи жилок.

Клетки эпидермиса лепестка прямоугольной формы с прямыми или слабоизвилистыми стенками. Наблюдаются клетки со слизью. Кутикула с верхней стороны слабо выражено штриховатая. В мезофилле располагаются друзы оксалата кальция. Волоски такие же, как на прицветном листе, присутствуют вильчатые волоски, состоящие из 2 извилистых клеток, сросшихся основаниями. Простые волоски встречаются редко с нижней стороны лепестка и по краю лепестка. На верхушке лепестка цветка клетки эпидермиса образуют сосочковидные выросты.

Клетки эпидермиса чашелистика многоугольные с прямыми и слабоизвилистыми стенками. Кутикула продольно-морщинистая. Устьица на верхней стороне аномоцитного типа. Волоски такие же, как на прицветномлисте и, кроме того, у основания чашелистиков с верхней

стороны располагаются длинные прямые параллельные волоски, состоящие из 2 параллельных клеток, сросшихся основаниями. В мезофилле располагаются друзы оксалата кальция. На поперечном срезе чашелистика видны крупные полости слизистых клеток.

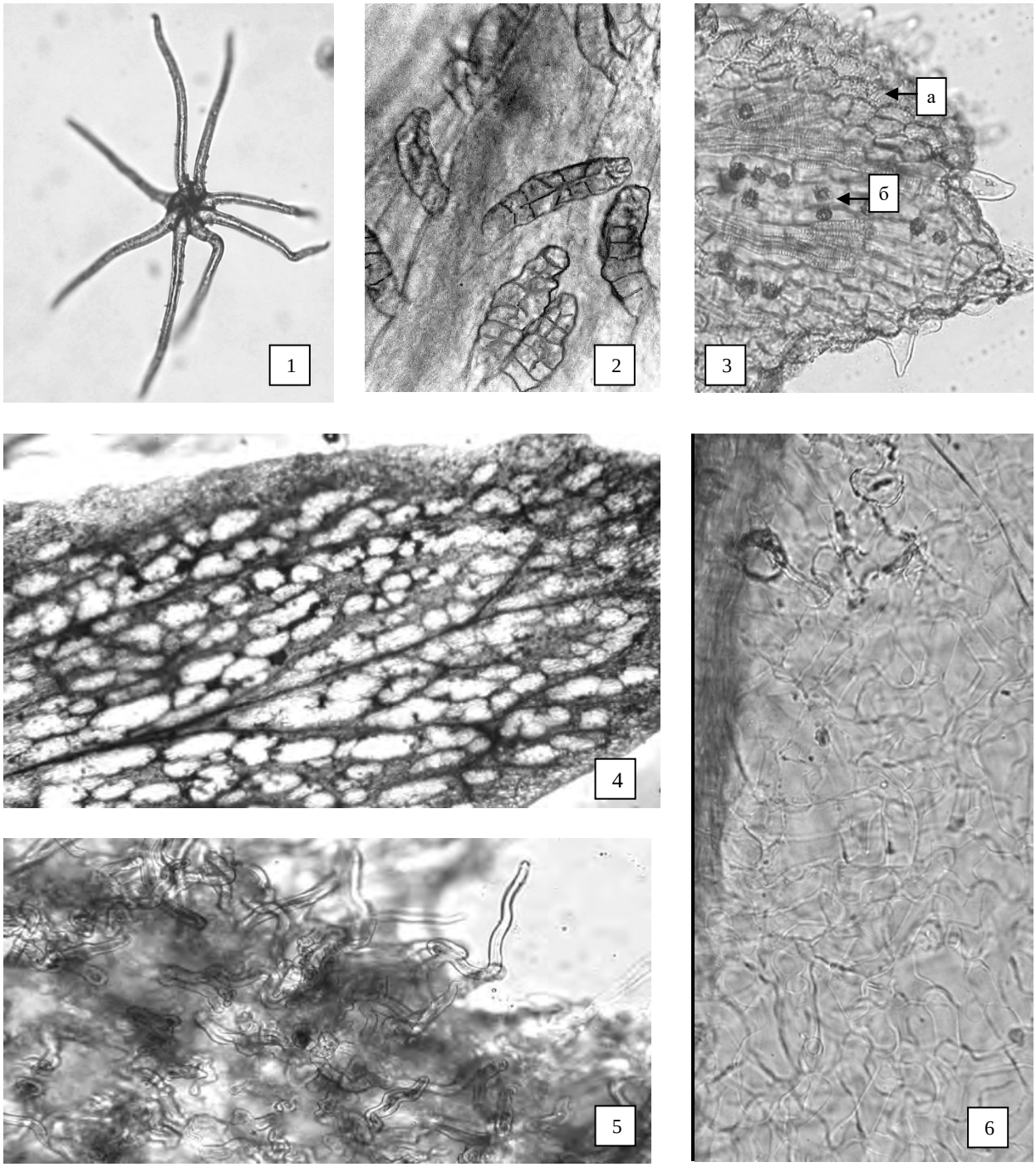
Пыльца округло-угловатая, гладкая, сплющенная с 3 щелевидными отверстиями.

Эпидермис цветоножки состоит из клеток прямоугольной формы с прямыми стенками без устьиц. В паренхиме содержатся друзы оксалата кальция. Проводящие пучки сопровождаются клетками-идиобластами с коричнево-оранжевым содержимым, механическими волокнами и пористыми толстостенными клетками.

Тычинки и пестик содержат друзы. Пестик опушен волосками, сидящими пучками и выходящими по 2–10 из общего основания. Волоски извилистые тонкостенные.

*Порошок.*При рассмотрении под микроскопом микропрепараты представляют собой смесь из различных частиц: фрагментов эпидермиса прицветного листа, состоящего из клеток с извилистыми стенками; продольно-морщинистой кутикулы; овальных устьиц аномоцитного типа (и без них); головчатых волосков, состоящих из многоклеточной овальной головки на короткой 1–3-клеточной ножке (и без них); звездчато-лучистых волосков, состоящих из 3–8 извилистых клеток, сросшихся основаниями (и без них); мезофилл листа очень рыхлый, типа аэренхимы, содержит друзы оксалата кальция, реже призматические кристаллы оксалата кальция, особенно многочисленные вблизи жилок; фрагментов лепестка с клетками эпидермиса прямоугольной формы с прямыми или слабоизвилистыми стенками, с вильчатыми волосками, состоящими из 2 извилистых клеток, сросшихся у основания (и без них), с просвечивающимися друзами в мезофилле; фрагментов чашелистика с многоугольными клетками эпидермиса с прямыми или извилистыми стенками, продольно-морщинистой кутикулой, с овальными устьицами аномоцитного типа (и без них), со

звездчато-лучистыми волосками, состоящими из 3–8 извилистых клеток, сросшихся основаниями, с вильчатыми волосками, состоящими из 2 извилистых клеток, сросшихся у основания (и без них), с длинными прямыми параллельными волосками, состоящими из 2 параллельных клеток, сросшихся основаниями (и безних); фрагментов цветоножки с эпидермисом, представленным клетками прямоугольной формы с прямыми стенками, с просвечивающимися в паренхиме друзами оксалата кальция, со звездчато-лучистыми волосками, состоящими из 3–8 извилистых клеток, сросшихся основаниями (и без них), с головчатыми волосками, состоящими из многоклеточной овальной головки на короткой 1–3-клеточной ножке (и без них); фрагментов тычинок, содержащих друзы в паренхиме; фрагментов пестика, содержащих друзы в паренхиме и имеющих на поверхности извилистые тонкостенные волоски, сидящие пучками и выходящие по 2– 10 из общего основания; пыльцы округло-угловатой гладкой сплющенной с 3 щелевыми отверстиями.



Рисунок–Липы цветки.

1 – звездчато-лучистый волосок (200×); 2 – головчатые волоски (200×); 3 – фрагмент верхушки лепестка цветка: а– сосочковидныеклетки эпидермиса, б – друзы оксалата кальция (200×); 4 – фрагмент лепестка с идиобластами со слизью (40×); 5 – вильчатые волоски (200×); 6 – аэренхима (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

1. ***Тонкослойная хроматография***

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) рутина. Около 0,005 г рутина (рутина тригидрата) растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в хорошо укупоренной упаковке, в прохладном защищенном от света месте.

Раствор СО кофейной кислоты. Около 0,002 г кофейной кислоты растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности растворане более 3 мес при хранении в прохладном защищенном от света месте.

Около 1,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл спирта 96 % и нагревают с обратным холодильником на водяной бане в течение 15 мин. После охлаждения содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят последовательно в одну полоску по 10 мкл раствора СО рутина и раствора СО кофейной кислоты, в другую полосу 10 мкл испытуемого раствора. Пластинку сушат при комнатной температуре в течение 10 мин, помещают в камеру, выложенную изнутри фильтровальной бумагой и предварительно насыщенную не менее 30 мин смесью растворителей этилацетат – толуол – муравьиная кислота безводная – вода (60:14:10:8) и хроматографируют восходящим способом.

Когда фронт растворителей пройдет около 80–90% от длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей под тягой при комнатной температуре.

Затем пластинку нагревают при температуре 100–105 °С в течение 5–10 мин и теплую обрабатывают последовательно дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира раствором 1 % в спирте96 %и макрогола 400 раствором спиртовым 5 %. Через 15 мин после обработки пластинку просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме растворов СО рутина и СО кофейной кислоты должна обнаруживаться зона адсорбции желтого или оранжево-желтого

цвета (рутин) и зона адсорбции голубого цвета (кофейная кислота).

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться следующие зоны: зонаадсорбции желтого или желто-оранжевого цвета на уровне зоны адсорбции СО рутина; зона адсорбции синего или фиолетово-синего цвета на уровне зоны адсорбции СО кофейной кислоты; допускается обнаружение других зонадсорбции (фенольные соединения).

2. ***Качественные реакции***

К 10 мл настоя цветков липы (1:20) прибавляют 30 мл спирта 96 % и перемешивают, появляется хлопьевидные сгустки, выпадающие в осадок при стоянии (полисахариды).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье,измельченное сырье, порошок* – не более 13 %.

Зола общая.*Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* – не более 10 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте.*Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 3 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* измельченных частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, –не более 3 %. *Измельченное сырье*: измельченных частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, –не более 5 %; измельченных частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, –не более 5 %. *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Соцветия с прицветниками и отдельные прицветники, поврежденные вредителями и пораженные ржавчиной.*Цельное сырье* –не более 2 %.

Изменившие окраску части соцветия(потемневшие и

почерневшие)*Цельное сырье, измельченное сырье* –не более 4 %.

Другие части липы(листья и побеги).*Цельное сырье,измельченное сырье* – не более 1%.

Соцветия, полностью отцветшие, с плодами*. Цельное сырье* –не более 2 %.

Осыпь отдельных цветков или соцветий без прицветников. *Цельное сырье* – не более15 %.

Органическая примесь.*Цельное сырье,измельченное сырье* – не более 0,3 %.

Минеральная примесь.*Цельное сырье, измельченное сырье,порошок* – не более 0,1 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение.*Цельное сырье, измельченное сырье, порошок:*сумма восстанавливающих сахаров (в составе полисахаридов) в пересчете на глюкозу – не менее 2 %.

Приготовление растворов.

Раствор СО глюкозы. Около 0,05 г (точная навеска) СО глюкозы (в пересчете на безводную) растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 250 мл, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают. Срок годности раствора 10 сут.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером2 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в круглодонную колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 60 мл спирта 75 %, 0,3 г кальция карбоната и нагревают на водяной бане с обратным холодильником в течение 45 мин. Охлаждают и фильтруют в мерную колбувместимостью 100 мл через бумажный фильтр, следя за тем, чтобы частицы сырья остались в круглодонной колбе. В круглодонную колбу прибавляют 30 мл спирта 75 % и проводят повторноеизвлечение флавоноидов при нагревании на водяной бане в течение 15 мин. Извлечение охлаждают и фильтруют через тот же фильтр в ту же мерную колбу вместимостью 100 мл,аккуратно сливают, следя за тем, чтобы частицы сырья остались в круглодонной колбе. Сырье и фильтр промывают 10 мл спирта 75 %,доводят объем раствора спиртом 75 % до метки и перемешивают (раствор А).

Вкруглодонную колбу с сырьем приливают 45 мл воды и нагревают на водяной бане с обратным холодильником в течение 60 мин, горячее извлечение фильтруют через стеклянный фильтр ПОР 160 диаметром 25 мм под вакуумом.Сырье на стеклянномфильтре и круглодонную колбу промывают5 мл воды. Извлечение количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора в колбе водой до метки и перемешивают (раствор Б).

20,0 мл раствора Б помещают в круглодонную колбу, прибавляют 7 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и кипятят с обратным холодильником в течение 10 мин. К полученному извлечению прибавляютпо каплям 6 мл натриягидроксида раствора 40 %, если раствор щелочной, то по каплям прибавляют раствор хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 % до pH 4,0–4,5. Полученный раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора водой до метки,

перемешивают. Фильтруют извлечение через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10–15 мл фильтрата (раствор В).

10,0 млраствора В помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 0,5 мл свинца(II) ацетата раствора 10 %, перемешивают. Через5 мин прибавляют 1,5 мл натрия фосфата раствора 5%, перемешивают, оставляют на 2 мин, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают, фильтруют через бумажный фильтр, отбрасывая первые 5–10 мл фильтрата (раствор Г).

В 4 конические колбы вместимостью 50 мл помещают по 2,5 мл пикриновой кислоты раствора 1 %, затем по 7,5 мл натрия карбоната раствора 20 %.В первую колбу прибавляют 5,0 мл раствора В (испытуемый раствор), во вторую – 5,0 мл раствора Г (раствор сравнения 1), в третью – 5,0 мл раствора СОглюкозы (раствор СОглюкозы), в четвертую – 5,0 мл воды(раствор сравнения 2). Колбы с содержимым погружают на 10 мин в водяную баню, затем охлаждают до комнатной температуры и содержимое количественно переносят в мерные колбы вместимостью 25 мл, доводят объем растворов в колбах водой до меток, перемешивают.

Измеряют оптическую плотностьиспытуемого раствора и раствора СОглюкозы на спектрофотометре при длине волны 470 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно растворов сравнения 1 и 2 соответственно.

Содержание суммы восстанавливающих сахаров (в составе полисахаридов)в пересчете на глюкозу и абсолютно сухое сырье в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 5 \cdot 50 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100 \cdot P}{A_0 \cdot 250 \cdot 25 \cdot a \cdot 20 \cdot 5 \cdot (100 - W) \cdot 100} = \frac{A \cdot a_0 \cdot P \cdot 50}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическаяплотность испытуемого раствора;
A_0 – оптическая плотность раствора СО глюкозы;
a– навеска сырья, г;
a_o–навескаСОглюкозы в пересчете на безводную глюкозу, г;

P – содержание основного вещества в СО глюкозы, %;
W– влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Лопуха корни **ФС.2.5.0025.15**

Arctii radices

Собранные осенью или ранней весной, очищенные от остатков стеблей, листьев, тонких корней, отмытые от земли, разрезанные на куски и высушенные корни дикорастущих и культивируемых двулетних травянистых растений лопуха большого – *Arctium lappa* L., лопуха паутинистого (войлочного) – *Arctium tomentosum* Mill., лопуха малого – *Arctium minus* (Mill.) Bernh., сем. астровых – *Asteraceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки*.Цельное сырье.* Цельные илиразрезанные на куски корни, длиной 20–40 см (у лопуха большого и лопуха паутинистого) и 10–30 см (у лопуха малого), толщиной 2,0– 3,5 см (у лопуха большого и лопуха паутинистого) и 1,5–2,5 см (у лопуха малого). Корни глубоко морщинистые, конусовидной формы, иногда спирально перекрученные. Излом неровный. Цвет снаружи темно-коричневый, на изломе желтовато-серый.

На поперечном разрезе под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×)видна небольшая светлая кора, темная линия камбия и широкая желтоватая древесина пористо-лучевого строения. Запах слабый, характерный. Вкус водного извлечения горьковатый.

*Измельченное сырье.*При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.

Цвет желтовато-серый, иногда с частично сохранившейся

морщинистой пробкой коричневого или темно-коричневого цвета. Запах слабый, характерный. Вкус водного извлечения горьковатый.

*Порошок.*При рассмотрении порошка под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки корней, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. При рассмотрении сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны бесформенные кусочки корней желтовато-серого цвета, иногда с частично сохранившейся морщинистой пробкой коричневого или темно-коричневого цвета.

Цвет порошкаот желтовато-серого до темно-коричневого.Запах слабый, характерный. Вкус водного извлечения горьковатый.

Микроскопические признаки*. Цельное сырье.*На поперечном срезе корня должны быть видна покровная ткань – пробка, представленная 2-–3 рядамиклеток темно-коричневого цвета. Клетки паренхимы коры крупные, тангентально-вытянутые со слегка утолщенными оболочками. Среди них хорошо виден ровный ряд клеток, иногда со светлым содержимым, окрашивающимся суданомIII в оранжевый цвет. В ряду этих клеток встречаются секреторные образования (ходы) округлой или овальной формы с коричневым содержимым. Клетки паренхимы внутренней части коры округлые; у более крупных корней паренхима коры рыхлая. Проводящие элементы луба образуют небольшие участки конусовидной формы, разделенные сердцевинными лучами. Лубяные волокна многочисленные, с утолщенными стенками и широкой полостью, расположены большими и малыми группами или диффузно среди элементов флоэмы. Линия камбия четкая, состоит из нескольких рядов клеток. В древесине видны одиночные или радиально расположенные группы пористых и сетчатых широкополосных сосудов, окруженных трахеидами, отдельные группы трахеид; клетки паренхимы мелкие. Встречаются сосуды, заполненные коричневым содержимым. Сердцевинные лучи одно- или многорядные, клетки их округлые. Паренхимные клетки внутренней части коры, древесины и сердцевинных лучей содержат глыбки инулина (препарат без нагревания).

Иногда паренхима древесины разрушена по сердцевинным лучам и имеет узкие радиально вытянутые полости, доходящие до линии камбия.

Измельченное сырье. При рассмотрении «давленых» препаратов должны быть видны фрагменты пробки темно-коричневого цвета, фрагменты паренхимы коры с секреторными образованиями (ходами) с коричневым содержимым; фрагменты паренхимы с глыбками инулина; группы лубяных волокон с утолщенными стенками или их фрагменты; фрагменты пористых и сетчатых широкополосных сосудов и трахеид.

*Порошок.*При рассмотрении микропрепарата порошка должны быть видны фрагменты пробки темно-коричневого цвета, фрагменты паренхимы с глыбками инулина, фрагменты лубяных волокон с утолщенными стенками, фрагменты пористых и сетчатых широкополосных сосудов.

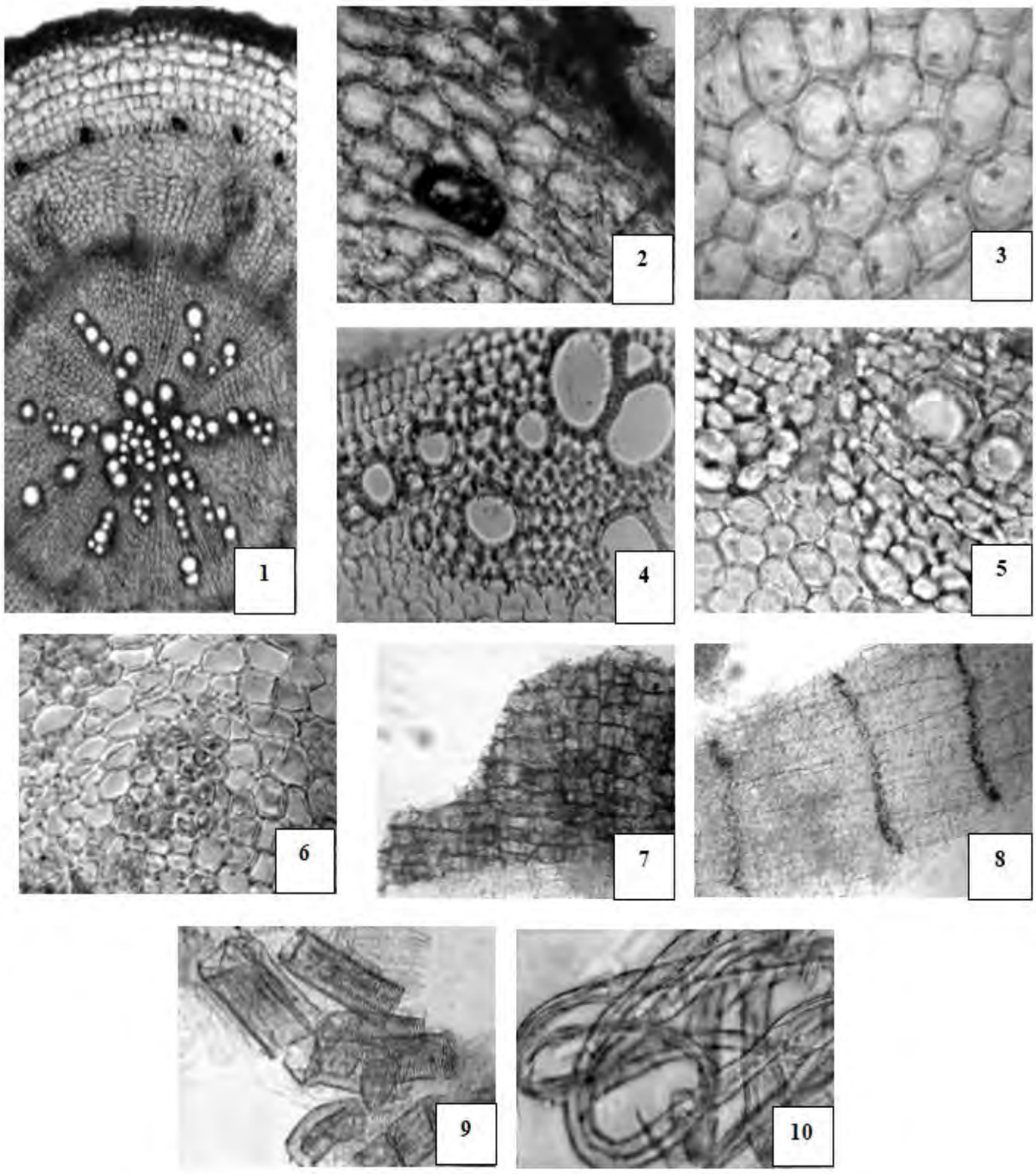


Рисунок – Лопуха корни.

1 – фрагмент поперечного среза (60×); 2 – фрагмент поперечного среза: клетки пробки, секреторный ход с коричневым содержимым, клетки паренхимы коры (200×); 3 – клетки паренхимы коры с глыбками инулина (300×); 4 – сосуды и трахеиды ксилемы, сердцевинные лучи (200×); 5 – сосуды ксилемы, клетки камбия, сердцевинный луч, клетки флоэмы (200×); 6 – волокна флоэмы (200×); 7–10 – фрагменты «давленого» препарата: 7 – клетки пробки (120×), 8 – секреторные ходы с коричневым содержимым в паренхиме коры (120×), 9 – проводящие элементы ксилемы (сосуды и трахеиды) (200×), 10 – лубяные волокна (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

1. ***Тонкослойная хроматография***

Раствор стандартного образца (СО)фруктозы. Около 0,1 г фруктозы растворяют в100 мл воды и перемешивают.Срок годности раствора 10сут при хранении в хорошо укупоренной упаковке, в прохладном защищенном от света месте.

Около 0,1г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером1 мм,помещают в колбу со шлифом вместимостью 50 мл и прибавляют 10 мл воды. Колбу присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на плитке в течение 1 ч, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Затем колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры и фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 10 мкл испытуемого раствора и 5 мкл раствора СО фруктозы. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин смесью растворителей бутанол–уксусная кислота–эфир–вода (9:6:3:1),и хроматографируют восходящим способом.Когда фронт растворителей пройдет около 80 –90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают и сушат до удаления следов растворителей. Пластинку последовательно обрабатывают тимолараствoромспиртовым 20 %, затем серной кислотой разведенной 16 % и выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100 – 105 ºС в течение 3 мин.

На хроматограмме СО фруктозы должна обнаруживаться зона адсорбции оранжево-красного цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться не менее двух зон адсорбцииоранжево-красного цвета: зона адсорбциина уровне зоны адсорбции СОфруктозы,зона адсорбции ниже нее; допускается обнаружение других зон адсорбцииоранжево-красного цвета (сахара).

2. ***Качественные реакции***

При нанесении на поперечный срез корня, на соскоб частиц измельченных корней или порошок 2–3 капель тимола раствора спиртового 20 % и 1 капли серной кислоты концентрированной должно наблюдаться оранжево-красное окрашивание (инулин).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность.*Цельное сырье, измельченное сырье,порошок*– не более 14 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье,порошок* – не более 11 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье,порошок* – не более 4,5 %.

Измельченность сырья.*Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, –не более 5 %.*Измельченное сырье:*частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, –не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %.*Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, –не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, –не более 5 %.

Посторонние примеси

Корни, потемневшие на изломе. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 5 %.

Остатки стеблей, в том числе отделенные при анализе, и другие части.*Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 5 %.

Органическая примесь.*Цельное сырье, измельченное сырье*–не более 0,5 %.

Минеральная примесь.*Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 1 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС

«Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение.*Цельное сырье, измельченное сырье, порошок:*суммаполисахаридов в пересчете на фруктозу –не менее 8 %;экстрактивных веществ, извлекаемых водой, –не менее 35 %.

Полисахариды

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 60 мл воды и нагревают на плитке в течение 30 мин. Полученное извлечение охлаждают до комнатной температуры и фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 200 мл, избегая попадания сырья на фильтр. Экстракцию повторяют еще дважды, каждый раз используя по 30 мл воды: первый раз в течение 30 мин, а второй– в течение 15 мин.

Сырье переносят на бумажный фильтр, промывают колбу, а затем промывают остаток на фильтре, используя каждый раз по 10 мл воды. К полученному извлечению прибавляют 2 мл свинца (II) ацетатараствора10 %, перемешивают и оставляют на 10 мин. Затем прибавляют 2 мл натрия фосфатараствора5 %, перемешивают и оставляют на 5 мин. Затем доводят объем раствора водой до метки и перемешивают Раствор фильтруют через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10–15 мл фильтрата (раствор А).

5,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (раствор Б).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 5 мл резорцинараствораспиртового0,1 %, прибавляют 5,0 мл раствора Б, доводят объем хлористоводородной кислотой 30 %до метки и перемешивают (раствор В).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 5 мл резорцинараствораспиртового0,1 %,прибавляют 5 мл воды, доводят объем хлористоводородной кислотой 30 % до метки и перемешивают (раствор сравнения).

Колбы с раствором сравнения и раствором В нагревают на водяной бане при температуре 80 ºС в течение 20 мин, охлаждают, доводят объем извлечений в колбах тем же растворителем до метки.

Оптическую плотность раствора Визмеряют на спектрофотометре при длине волны 482 нм в кювете с толщиной слоя 10 ммотносительно раствора сравнения.

Содержание суммы полисахаридов в пересчете на фруктозу и абсолютно сухое сырье в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 200 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 5 \cdot 5 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 2000000}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где *A*– оптическая плотность раствора В;

$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения продуктов реакции фруктозы с резорцином в кислой среде при длине волны 482 нм, равный 298;

a– навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Экстрактивные вещества.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1, экстрагент – вода).

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Льна посевногосемена **ФС.2.5.0026.15**

Lini usitatissimi semina

Собранные в период плодоношения зрелые и высушенные семена культивируемого травянистого растения льна посевного (обыкновенного) – *Linum usitatissimum* L., сем.льновых–*Linaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки*.Цельное сырье.* Семена сплюснутые, яйцевидной формы, заостренные с одного конца и округлые с другого, неравнобокие, длиной до 6 мм, шириной до 3 мм. Поверхность семян гладкая, блестящая, со светло-желтым, ясно заметным семенным рубчиком (под лупой 10× или стереомикроскопом 16×).Цвет семян от светло-желтого до темно-коричневого. Запах отсутствует.Вкус водного извлечения слизисто-маслянистый.

Микроскопические признаки*. Цельное сырье.* При рассмотрении поперечного среза семени должны быть видны: кожура в виде темно-коричневой полосы, эндосперм и зародыш. При большом увеличении ясно различаются слои семенной кожуры. Эпидермис состоит из крупных, четырехугольных клеток, покрытых толстым слоем кутикулы, содержащих слизь; боковые (радиальные) стенки клеток слегка извилистые, при разбухании слизи способны выпрямляться и вытягиваться. Под эпидермисом располагается 1–2 ряда рыхлых паренхимных клеток почти округлой формы. Третий слой представлен механической тканью, состоящей из одного ряда сильно утолщенных, одревесневших желтых клеток, пронизанных поровыми канальцами.

Под механической тканью расположены узкие тонкостенные клетки «поперечного слоя» (вытянуты поперек семени). Самый внутренний слой кожуры – пигментный – состоит из одного ряда четырехугольных клеток с заметно утолщенными пористыми оболочками и темно-желтым содержимым. Эндосперм состоит из многоугольных клеток, которые содержат алейроновые зерна, включающие кристаллоиды, глобоиды, и капли жирного масла (реакция с суданомIII). Ткань семядолей отличается более мелкими клетками.

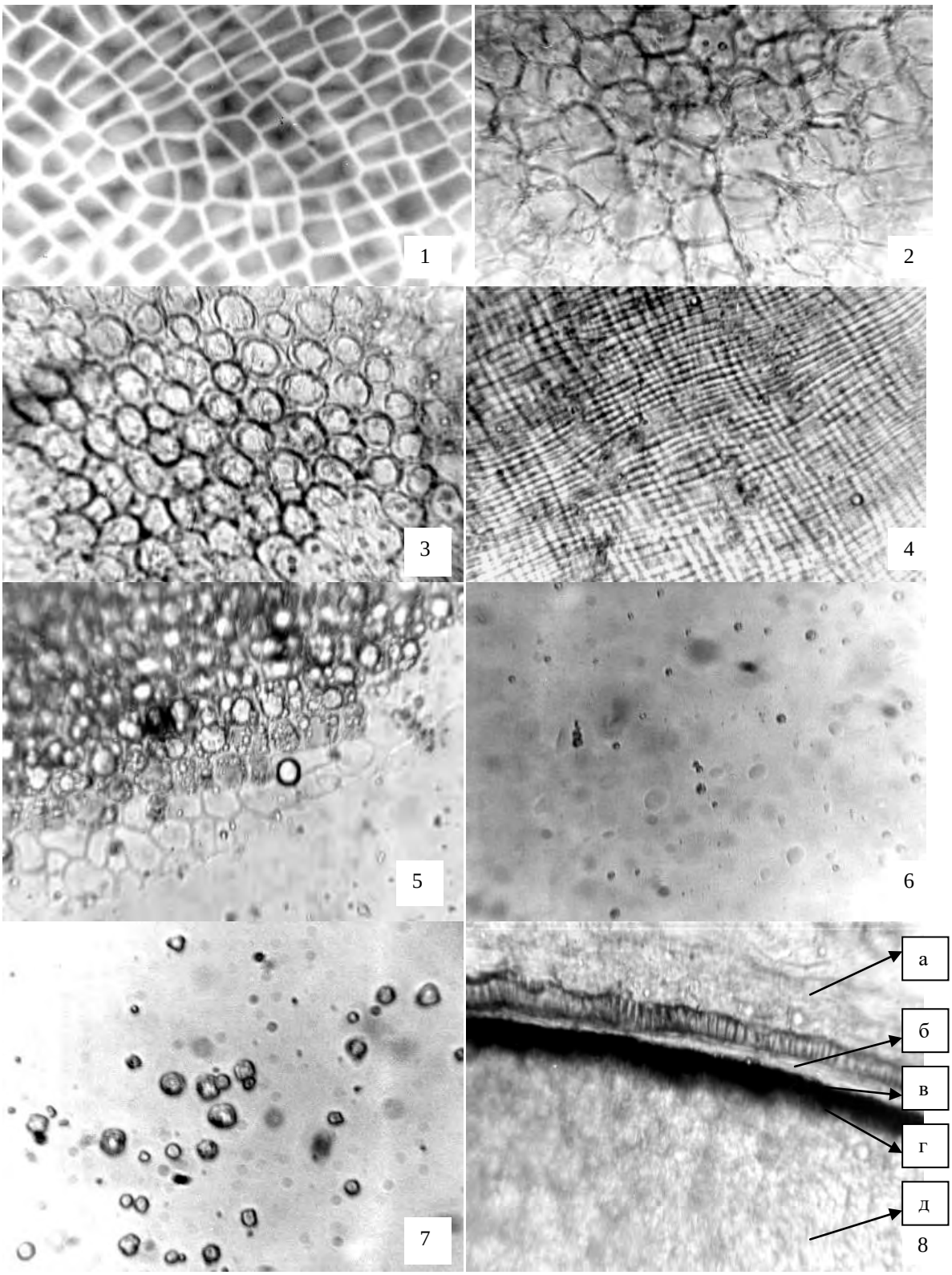


Рисунок – Льна посевного семена.

1 –эпидермис (250×); 2 – паренхима (250×); 3 – механическая ткань (250×); 4 –поперечный слой (250×); 5 – эндосперм (250×); 6–капли жирного масла и алейроновые зерна (250×); 7 – алейроновые зерна с кристаллоидами и глобоидами (500×); 8 – поперечный срез семени льна (250×): а–паренхимный слой кожуры, б – механический слой, в – клетки поперечного слоя, г–

пигментный слой, д – эндосперм семени.

Определение основных групп биологически активных веществ

Семена льна измельчают до отсутствия цельных семяни помещают на предметное стекло в каплю туши (разведенную водой 1:10), тщательно размешивают и накрывают покровным стеклом;на темно-сером (почти черном) фоне должны выделяться белымипятнами клетки со слизью.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность.*Цельное сырье* -не более 13 %.

Зола общая. *Цельное сырье* -не более 6 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте.*Цельное сырье* - не более 0,5 %.

Посторонние примеси

Другие части растения (части коробочек, плодоножек, битых семян).*Цельное сырье* -не более 1 %.

Органическая примесь.*Цельное сырье* -не более 2 %.

Минеральная примесь.*Цельное сырье* -не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение.*Цельное сырье:* сумма полисахаридов - не менее 7 %.

Аналитическую пробу измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Около 10,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещаютв колбу со шлифом вместимостью 500 мл, прибавляют 200 мл воды, колбу присоединяют к обратномухолодильнику и кипятят при перемешивании на электрической плитке в течение 30 мин. Экстракциюводой повторяют еще 2 раза: первый раз используя 200 мл воды, второй раз – 100 мл воды. Водные извлечения объединяют, охлаждают до комнатной температуры,фильтруют в мерную колбувместимостью 500 мл через 5 слоев марли, вложенной в стеклянную воронку диаметром 66 мм ипредварительно смоченной водой. Фильтр промывают водой, доводят объем раствора водой дометки и перемешивают (раствор А).

25,0 мл раствора А помещают в стакан вместимостью 200 мл, прибавляют 100 мл спирта 96 %,перемешивают, подогревают на водяной бане при температуре 60°С в течение 5 мин. Через 1 ч содержимое стакана переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют соскоростью 5000 об/мин в течение 30 мин. Надосадочную жидкость фильтруют под вакуумом при остаточном давлении 13-16 кПа черезвысушенный до постоянной массы при температуре 100-105 °С стеклянный фильтр ПОР 16диаметром 40 мм. Затем осадок количественно переносят на тот же фильтр и промывают 20 мл этилацетата. Фильтр с осадком сушат сначала на воздухе, затем при температуре100-105 °С до постоянной массы.

Содержание суммы полисахаридов в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляютпо формуле:

$$X = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 500 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot 25 \cdot (100 - W)} = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 2000000}{a \cdot (100 - W)},$$

где m_1–масса фильтра, г;
m_2–масса фильтра с осадком, г;
a– навеска сырья, г;
W– влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с

требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Марены корневища и корни **ФС.2.5.0083.18**

Rubiae rhizomata et radices **Взамен ГФ XI, вып. 2, ст. 76**

Собранные весной в начале вегетации или осенью в период плодоношения, тщательно очищенные от земли и высушенные корневища и корни дикорастущих и культивируемых многолетних травянистых растений марены красильной - *Rubia tinctorum* L. и марены грузинской - *Rubia iberica (Fish. ex DC). C. Koch*, сем. мареновых - *Rubiaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Корневища и корни продольноморщинистые, цилиндрические, различной длины, толщиной 2 -18 мм, обычно с отслаивающейся шелушащейся пробкой. У корневищ в центре обычно имеется полость.

Цвет корневищ и корней снаружи красновато-коричневый, на изломе видна красновато-коричневая кора и оранжево-красная древесина. Запах слабый, характерный. Вкус водного извлечения сладковатый, затем слегка вяжущий и горький.

Измельченное сырье. Смесь кусочков корневищ и корней различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет красновато-коричневый, оранжево-красный. Запах слабый, характерный. Вкус водного извлечения сладковатый, затем слегка вяжущий и горький.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* На поперечном срезе корня или корневища должны быть видны несколько слоев клеток пробки представленных прямоугольными клетками с очень тонкими стенками. Наружные слои клеток пробки полуразрушены и отслаиваются. Сердцевинные лучи не выражены. Кора состоит из тонкостенных клеток, клетки лубя-

ной паренхимы располагаются радиальными рядами. В клетках паренхимы встречаются рафиды оксалата кальция. Линия камбия узкая. Древесина имеет извилистый контур. Сосуды лежат небольшими группами. В полости сосудов часто встречаются тиллы. Паренхимные клетки древесины утолщены и одревесневшие, расположены радиальными рядами.

В корневище центральная часть занята сердцевиной, состоящей из крупных овальных клеток с утолщенными оболочками, пронизанными овальными порами, иногда сердцевина частично разрушена. Изредка в клетках сердцевины встречаются рафиды оксалата кальция.

Измельченное сырье. При рассмотрении «давленного» микропрепарата должны быть видны фрагменты пробковой ткани, состоящей из многоугольных или прямоугольных клеток, фрагменты сетчатых сосудов, фрагменты паренхимных клеток с рафидами оксалата кальция, одиночные игольчатые кристаллы.

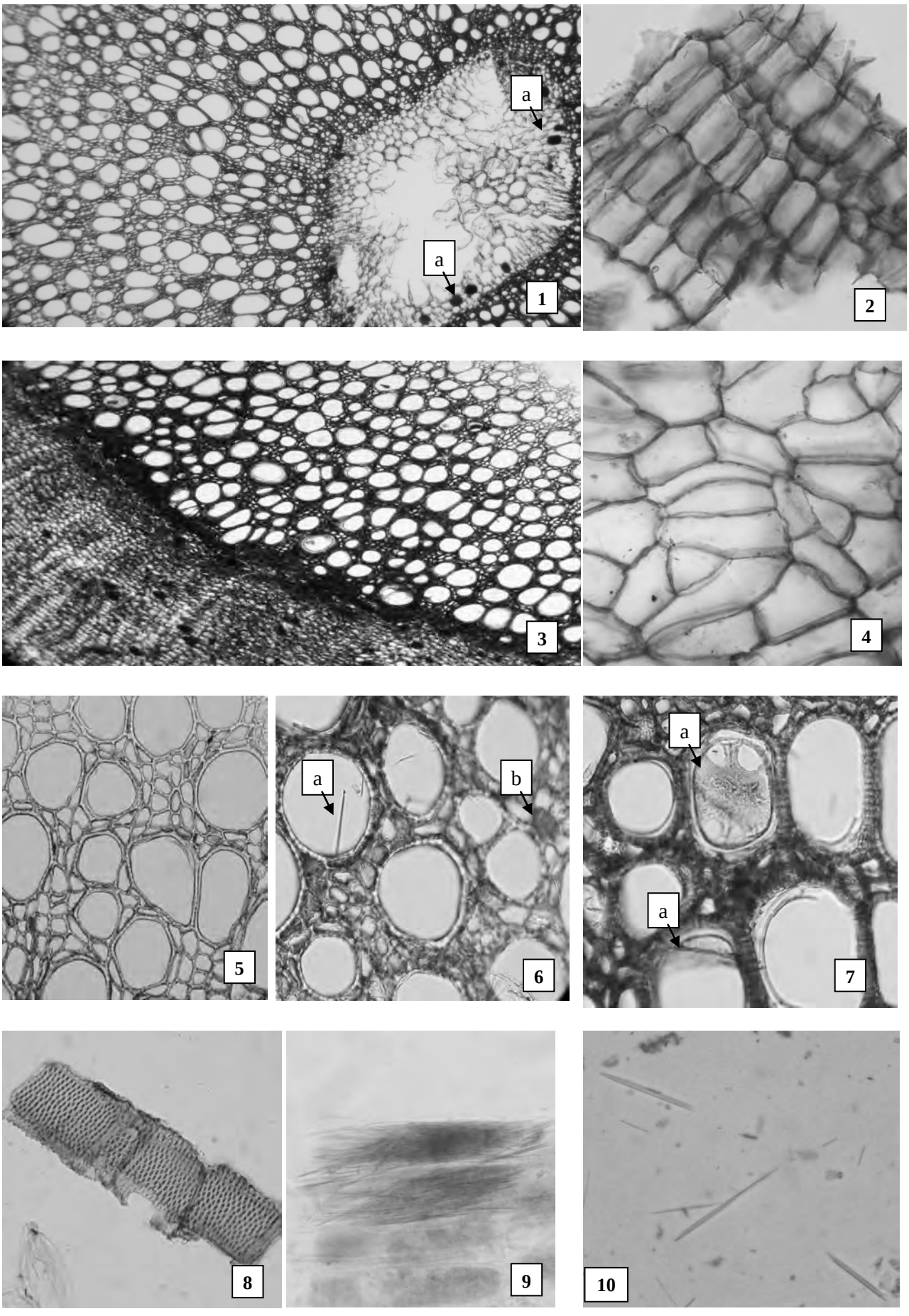


Рисунок - Марены корневища и корни

1 – фрагмент поперечного среза корневища с рафидами оксалата кальция «a» (40×); 2 – фрагмент пробки - поперечный срез (200×); 3 – фрагмент поперечного среза корня (200×); 4 – фрагмент пробки - вид с поверхности (200×); 5 – сосуды древесины (200×); 6 – сосуды древесины с игольчатым кристаллом «a» и рафидами «b» оксалата кальция (200×); 7 – сосуды древесины с тиллами «a» (200×); 8 – фрагмент сетчатого сосуда – «давленый» микропрепарат (200×); 9 – рафиды оксалата кальция – «давленый» микропрепарат (400×); 10 – игольчатые кристаллы оксалата кальция– «давленый» микропрепарат (400×).

Люминесцентная микроскопия. При рассмотрении поперечного среза корня (без включающей жидкости) в УФ-свете должна быть видна тусклая, почти черная пробка. Кора должна иметь интенсивное желтовато-оранжевое или красновато-оранжевое свечение (антраценпроизводные). Оболочки древесных сосудов и трахеид яркие зеленовато-голубые, содержимое клеток древесной паренхимы желтовато-оранжевое или красновато-оранжевое. В отдельных сосудах, на месте тиллов, встречаются сростки кристаллов с очень яркой желтовато-оранжевой или красновато-оранжевой люминесценцией (руберитриновая кислота).

В корневище сердцевина имеет такое же свечение, как и кора.

Определение основных групп биологически активных веществ

Приготовление растворов.

Раствор магния ацетат спиртового 2 %. 2 г магния ацетата растворяют в спирте 96 % в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают. Срок годности раствора 1 меяц.

Качественная реакция

0,2 г сырья, измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,25 мм, помещают в плоскодонную колбу вместимостью 50 мл и прибавляют 20 мл воды. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Полученный раствор охлаждают до комнатной температуры, прибавляют 1 мл уксусной кислоты ледяной, перемешивают. 5 мл полученного раствора помещают в де-

лительную воронку вместимостью 50 мл прибавляют 5 мл хлороформа и взбалтывают в течение 1 мин. После разделения слоев хлороформное извлечение (нижний слой) сливают в колбу вместимостью 30 мл. Извлечение хлороформом повторяют еще два раза порциями по 5 мл. К объединенному хлороформному извлечению прибавляют 10 мл натрия гидроксида раствора 10 % и встряхивают в течение 1 мин; должно наблюдаться фиолетовое или фиолетово-красное окрашивание верхнего слоя (свободные антрахиноны).

Тонкослойная хроматография

Оставшийся водный слой после извлечения хлороформом (3 раза по 5 мл) фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором наносят в виде полосы длиной 10 мм и шириной не более 2 см 15 мкл (0,015 мл) испытуемого раствора. Пластинку с нанесенной пробой сушат при температуре около 100 °С в течение 7 мин и помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 30 мин смесью растворителей спирт 96 % - хлороформ - толуол - уксусная кислота ледяная (15:15:10:10), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта ее вынимают из камеры, сушат при температуре около 100 °С в течение 3 мин и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме испытуемого раствора в нижней половине должны обнаруживаться 2 зоны адсорбции с флуоресценцией оранжевого цвета (антраценпроизводные); допускается обнаружение других зон адсорбции.

Затем пластинку опрыскивают магния ацетата раствором спиртовым 2 % и выдерживают при температуре 100 °С в течение 3 мин и просматривают в УФ-свете при 365 нм.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией желтого цвета (нижняя из двух зон адсорбции с флуоресценцией оранжевого цвета); допускается обнаружение других зон ад-

сорбции.

При взаимодействии эфирных извлечений с раствором натрия гидроксида 30 % и щелочно-аммиачным раствором (раздел «Количественное определение») должно наблюдаться красно-фиолетовое окрашивание (антраценпроизводные).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 13 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 10 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 4 %.

Измельченность сырья. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; измельченных частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,25 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Других частей растения (стеблей, листьев и др.)**.** *Цельное сырье* – не более 1,5 %.

Органической примеси. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1 %.

Минеральной примеси. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями

ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. ***Связанные производные антрацена***.

Цельное сырье, измельченное сырье: связанных производных антрацена – не менее 3 %.

Приготовление растворов.

Щелочно-аммиачный раствор. 50 г натрия гидроксида растворяют при перемешивании в 870 мл воды. После охлаждения раствора прибавляют 80 мл аммиака раствора концентрированного 25 % и перемешивают. Раствор годен в течение суток.

1. *Определение суммы производных антрацена.*

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,25 мм.

Около 0,1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 200 мл, приливают 7,5 мл ледяной уксусной кислоты, 1 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной бане при слабом кипении в течение 15 мин; при этом колбу периодически встряхивают вращательным движением, смывая появляющийся на ее стенках осадок. Затем колбу охлаждают холодной водой и проводят экстракцию эфиром 3 раза по 30 мл при нагревании на водяной бане с обратным холодильником (температура не выше 35 °С) в течение 15 мин с момента закипания эфира. После охлаждения колбы объединенное эфирное извлечение фильтруют через вату в делительную воронку вместимостью 250 мл.

Эфирное извлечение промывают 2 раза по 20 мл воды. При непрерывном охлаждении к эфирному извлечению приливают малыми порциями сначала 15 мл натрия гидроксида раствора 30 %, затем 25 мл щелочно-аммиачного раствора. Затем, не переставая охлаждать, смесь встряхивают в течение 5 мин, окрашенный раствор собирают в мерную колбу вместимостью

500 мл. Экстракцию щелочно-аммиачным раствором повторяют несколько раз до прекращения окрашивания щелочного раствора.

К объединенному извлечению прибавляют 3 капли пергидроля, тщательно перемешивают, доводят объем раствора щелочно-аммиачным раствором до метки и перемешивают. Через 10 мин измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 530 нм в кювете с толщиной слоя 5 мм, используя в качестве раствора сравнения щелочно-аммиачный раствор.

По калибровочному графику находят содержание производных антрацена в граммах в 1 мл раствора.

Содержание суммы производных антрацена в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{C \cdot 500 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot (100 - W)}$$

где C - содержание свободных производных антрацена в 1 мл раствора, найденное по калибровочному графику, в граммах;

a - навеска сырья в граммах;

W - влажность сырья в процентах.

2. *Определение свободных производных антрацена.*

Около 0,1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 300 мл, прибавляют 50 мл эфира и нагревают на водяной бане с обратным холодильников в течение 10 мин с момента закипания эфира. Экстракцию повторяют трижды, затем колбу охлаждают и эфирные извлечения фильтруют через вату в делительную воронку вместимостью 20 мл. Воронку с эфирным извлечением охлаждают и производные антрацена извлекают 4 раза по 20 мл щелочно-аммиачным раствором, каждый раз встряхивая в течение 5 мин. Щелочной раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 1 каплю пергидроля, объем раствора доводят щелочно-аммиачным раствором до метки и перемешивают.

Измеряют оптическую плотность полученного раствора как указано при определении суммы производных антрацена («1»).

Содержание свободных производных антрацена в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (X_1) вычисляют по формуле:

$$X_1 = \frac{C \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot (100 - W)}$$

где C - содержание свободных производных антрацена в 1 мл раствора, найденное по калибровочному графику, в граммах;

a - навеска сырья, в граммах;

W - влажность сырья, в процентах.

Содержание связанных производных антрацена в пересчете на абсолютно сухое сырье (в процентах X_2) вычисляют по формуле:

$$X_2 = X - X_1.$$

Построение калибровочного графика. 50 г кобальта хлорида ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$), высушенного до постоянной массы, помещают в мерную колбу вместимостью 500 мл, растворяют в 250 мл воды, прибавляют 1 мл хлористоводородной кислоты 25 %, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Полученный раствор является исходным (№ 10). Из этого раствора готовят серию разбавленных растворов (№ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9), содержащих кобальта хлорида соответственно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 и 90 мг в 1 мл, и измеряют их оптические плотности на спектрофотометре при длине волны 530 нм. Для построения калибровочного графика на оси абсцисс откладывают концентрацию растворов, а на оси ординат - их оптическую плотность.

При этом концентрации растворов кобальта хлорида выражают в соответствующих концентрациях свободных производных антрацена, пользуясь таблицей.

Таблица – Соотношения содержания свободных производных антрацена, содержащего кобальта хлорида ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$), г/мл в растворе

№ рас-	Содержание	Содержание	№ рас-	Содержание	Содержание

твора	кобальта хлорида ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$), г/мл	свободных производных антрацена, г/мл	твора	кобальта хлорида ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$), г/мл	свободных производных антрацена, г/мл
1	0,010	0,0000027	6	0,060	0,0000176
2	0,020	0,0000060	7	0,070	0,0000204
3	0,030	0,0000088	8	0,080	0,0000233
4	0,040	0,0000117	9	0,090	0,0000260
5	0,050	0,0000146	10	0,100	0,0000281

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Мать-и-мачехи обыкновенной листья ФС.2.5.0027.15

Tussilaginis farfarae folia

Собранные в первой половине лета и высушенные листья дикорастущего многолетнего травянистого растения мать-и-мачехи обыкновенной –*Tussilago farfara* L., сем.астровых –*Asteraceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки.*Цельное сырье*. Листья цельные или частично измельченные, простые, черешковые, длина листовой пластинки до 15 см, ширина до 10 см; округло- или широкояйцевидные, с острой верхушкой и сердцевидным основанием; край неравномерно выемчато-зубчатый; сверху голые, снизу плотно и мягко беловойлочные. Листья не должны быть слишком молодыми, не должны иметь густогоопушения на верхней стороне листовой пластинки.

При рассмотрении сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видно, что верхняя сторона листовой пластинки голая, местами на жилках расположены длинные тонкие спутанные волоски; нижняя сторона листа беловойлочная от обилия спутанных длинных волосков.Черешки листьев длиной до 5 см, тонкие, округлые или полукруглые в сечении, ребристые, сверху желобоватыес войлочным опушением.Цвет листьев с верхней стороны зеленый или желтовато-зеленый, иногда с коричневато-фиолетовыми или фиолетовыми пятнами, с нижней стороны – беловато-серый или зеленовато-серый; черешков – коричневато-зеленый, желтовато-коричневый или фиолетово-зеленый. Запах отсутствует.Вкус водного извлечения слабо-горьковатый с ощущением слизистости.

Измельченное сырье. Кусочки листьев различной формы, проходящие сквозь сито с размером отверстий 7 мм.

При рассмотрении листьев под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки листьев, иногда с редкозубчатым краем и почти черными кончиками зубцов, голых и зеленых или желтовато-зеленых с извилисто-морщинистой поверхностью, иногда с коричневато-фиолетовыми или фиолетовыми пятнами с одной стороны и беловойлочно-опушенных или голых (волоски опали при измельчении) с беловато-серой, зеленовато-серой, реже коричневато-желтой мелкоямчатой поверхностью с другой стороны; кусочки коричневато-зеленых и фиолетово-зеленых черешков.

Цвет измельченного сырья светло-зеленый, зеленый, беловато-серый, серовато-зеленый, с желтовато-зелеными, коричневато-зелеными, светло-коричневыми или фиолетовыми вкраплениями. Запах отсутствует.Вкус водного извлечения слабо-горьковатый с ощущением слизистости.

Примечания. Возможные примеси:

А) Лопухвойлочный (*Arctiumtomentosum*Mill.). Молодые прикорневые листья лопуха войлочного простые, цельные, длинночерешковые, образуют розетку; яйцевидной формы, с тупой верхушкой или с остроконечием, сердцевидным основанием и цельнокрайние или с расставлено зубчатым краем. Сверху листья – голые или слегка опушенные; снизу – с беловато-войлочным опушением. Отчетливо видна широкая главная жилка. При рассмотрении листьев под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видно, что верхняя сторона листовой пластинки покрыта прижатыми волосками; нижняя – с густо, серовато- или беловато-паутинисто-войлочным опушением и желтыми сидячими железками. Цвет листьев с верхней стороны зеленый, с нижней – серовато-зеленый; черешков – светло-зеленый или серовато-зеленый.

Б) Лопух большой (*Arctiumlappa*L.). Молодые прикорневые листья лопуха большого простые, цельные, длинночерешковые, образуют розетку; широко-сердцевидно-яйцевидной формы, с тупой верхушкой, сердцевидным или выемчатым основанием и мелко выемчато-зубчатым краем или цельнокрайние. Сверху листья – голые или с редкими короткими волосками; снизу – опушенные.

При рассмотрении листьев под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видно, что верхняя сторона листовой пластинки покрыта редкими короткими волосками; нижняя – с серовойлочным опушением и рассеянными желтыми сидячими железками.Цвет листьев с верхней стороны зеленый, с нижней – серовато-зеленый; черешков – зеленовато-коричневый.

В) Белокопытник холодный (*Petasitesfrigidus* (L.) Fr.).

Прикорневые (настоящие) листья белокопытника холодного простые, длинночерешковые, образуют прикорневую розетку, треугольно-сердцевидные, заостренные, 3–15 см длиной и почти такой же ширины. По краям глубоко выемчато-зубчатые, почти лопастные. Сверху листья – почти голые, снизу – с войлочным опушением.

При рассмотрении сухих листьев под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видно, что верхняя сторона листовой пластинки слегка паутинисто-пушистая или почти голая, нижняя – плотно серовато-войлочная.

Цвет листьев с верхней стороны зеленовато-коричневый, с нижней – серо-зеленый или серо-коричневый; черешков – серо-зелено-коричневый.

Г) Белокопытник гладкий (сияющий) (*Petasitesradiatus* (J.F. Gmel.)J. Toman).

Настоящие (прикорневые) листья белокопытника гладкого простые, цельные, крупные, длинночерешковые, треугольно-почковидные, коротко заостренные, широкозубчатые, 5–15 см длиной и 10–25 см шириной, совершенно голые.

При рассмотрении листьев под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видно, что верхняя сторона листовой пластинки голая, нижняя – с редким клочковатым пушком.

Цвет листьев зеленый, сухих листьев с верхней и нижней стороны– зеленовато-коричневый или серовато-коричневый; черешков – темно-коричневый.

Микроскопические признаки.*Цельное сырье, измельченное сырье.* При рассмотрении с поверхности эпидермиса верхней стороны листовой пластинки видны крупные многоугольные клетки с прямыми или четковидно-утолщенными боковыми стенками. Над жилками эпидермальные клетки вытянуты, остальные – изодиаметрические. Кутикула толстая, морщинисто-складчатая, над жилками продольно-складчатая.

Клетки нижнего эпидермиса с сильно извилистыми стенками. Кутикула толстая, морщинисто-складчатая, над жилками продольно-складчатая. Устьица крупные, овальные, окруженные 4–8 клетками эпидермиса (аномоцитный тип), расположены на верхней и нижней стороне листа, с нижней стороны их больше (амфистоматический лист), и они погружены в мезофилл (погруженные устьица). Углубления, в которых находятся устьица, прикрыты устьичными криптами из 4–8 клеток (выросты эпидермиса).

Вокруг устьиц заметна радиальная складчатость кутикулы. Под эпидермисом видна аэренхима.

Клетки аэренхимы расположены однорядными цепочками, образующими крупные воздухоносные полости.

Верхняя сторона листа почти голая, нижняя – покрыта многочисленными простыми бичевидными волосками и волосками со спавшимися стенками. На верхнем эпидермисе видны места прикрепления волосков, вокруг которых клетки эпидермиса с почти прямыми стенками и радиальной складчатостью кутикулы, расположенные лучисто, образуют розетку. В центре розетки виден круглый валик. Бичевидные волоскисостоят из короткого основания, образованного 3–6 небольшими клетками, и длинной конечной, шнуровидной, сильно извилистой клеткой. Волоски переплетаются между собой. Встречаются фрагменты эпидермиса нижней стороны листа характерного строения, но без волосков (опали при измельчении), при этом видны округлые места их прикрепления.

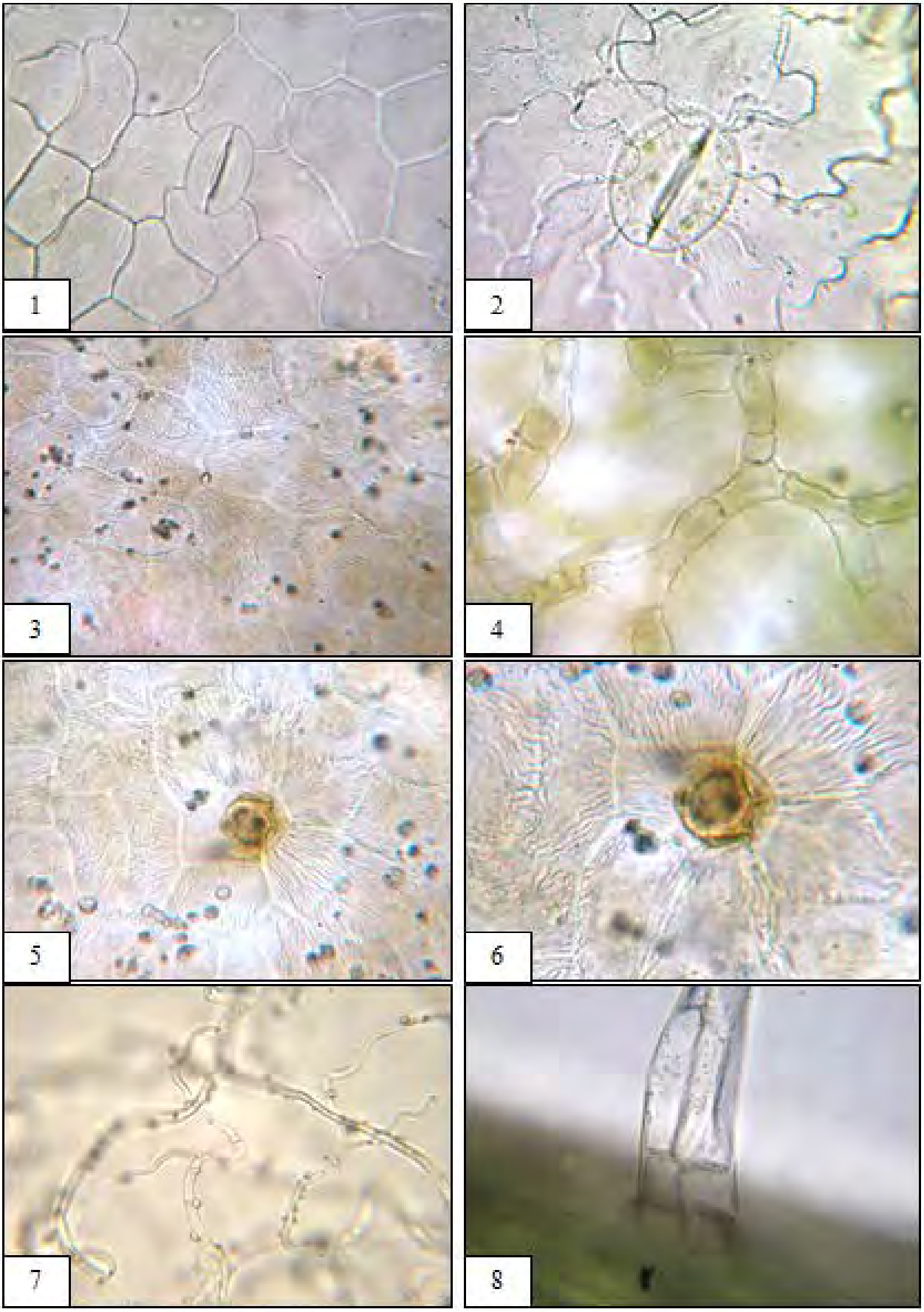


Рисунок – Мать-и-мачехи обыкновенной листья.

1 – верхний эпидермис с устьичными комплексом из 4 – 5 клеток и погруженными устьицами (аномоцитный тип)(640×); 2 нижний эпидермис с устьичнымикомплексом из 4–5 клетоки погруженными устьицами (аномоцитный тип)(640×); 3 – морщинисто-складчатая кутикула верхнего эпидермиса(640×); 4– аэренхима; 5, 6 – местоприкрепления волоска(640×); 7– бичевидные волоски(640×); 8 – основание волоска (640×).

Определение основных групп биологически активных веществ

1. Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов

Раствор стандартного образца(СО) рутина. Около 0,001 г рутина (рутина тригидрата) растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности растворане более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около 1,0 гсырья,измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм (войлочные комья волосков, не прошедшие сквозь сито – отбрасывают), помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл спирта 96 %, нагревают на водяной бане с обратным холодильником в течение 10 мин. После охлаждения до комнатной температуры полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят по 20 мкл испытуемого раствора и раствора СО рутина. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре в течение 15 мин, помещают в камеру,выложенную изнутри фильтровальной бумагой ипредварительно насыщеннуюв течениене менее 30 минсмесью растворителей этилацетат - муравьиная кислота безводная - вода (40:4:6), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80–90% длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей в вытяжном шкафу, после чего просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО рутина должна обнаруживаться зона бледно-желтого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должно обнаруживаться не менее 4 зон абсорбции выше зоны адсорбции СО рутина: две желтовато-серые зоны адсорбции; над ними две голубовато-серые зоны, при этом нижняя зона адсорбции в два раза шире верхней; допускается обнаружение других зон адсорбции.

Затем пластинку нагревают в сушильном шкафу в течение 2-3 мин при 100-105 ºС, еще теплую обрабатываютдифенилборной кислоты аминоэтилового эфира раствором 1% в спирте 96 % и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО рутина должна обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией желтого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться выше зоны адсорбции СО рутина: зона адсорбции с флуоресценцией голубого цвета, которая почти не разделена с зонойадсорбции с флуоресценцией желтого цвета над ней, выше них зона адсорбции с флуоресценцией желтого цвета, над ними 2 зоны адсорбции с голубой флуоресценцией;допускается обнаружение других зон адсорбции (флавоноиды).

2. Качественные реакции

Около 10,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, помещают в колбу со шлифом вместимостью 500 мл, прибавляют 200 мл воды, колбу присоединяют к обратному холодильнику и кипятят при перемешивании на плитке в течение 30 мин. Экстракцию повторяют еще 2 раза, используя первый раз 200 мл, второй раз 100 мл воды. Водные извлечения объединяют и центрифугируют с частотой вращения 5000 об/мин в течение 10 мин и декантируют в мерную колбу вместимостью 500 мл через 5 слоев марли, вложенной в стеклянную воронку диаметром 55 мм и предварительно промытую водой. Фильтр промывают водой, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

а) К 10 мл приготовленного раствора прибавляют 30 мл спирта 96 % и перемешивают; должны появляться хлопьевидные сгустки, выпадающие в осадок при стоянии (полисахариды).

б) Раствор с осадком фильтруют через стеклянный фильтр ПОР 16, осадок с фильтра переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл с натрия гидроксида раствором 0,1 М и им же доводят раствор до метки, перемешивают. К 1 мл полученного раствора прибавляют 0,25 мл карбазолараствора 0,5 % и 5 мл серной кислоты концентрированной, перемешивают и нагревают на водяной бане в течение 10 мин; появляется красно-фиолетовое окрашивание (галактуроновая кислота).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность.*Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 13 %.

Зола общая.*Цельное сырье,измельченное сырье* – не более 20 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте.*Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 10 %.

Измельченность сырья.*Цельное сырье:* измельченных частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, –не более 5 %.*Измельченное сырье*: частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, –не более 20 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, –не более 5 %.

Посторонние примеси.

Листья темно-коричневые и с темно-коричневыми пятнами ржавчины.*Цельное сырье,измельченное сырье* – не более 8 %.

Органическая примесь.*Цельное сырье,измельченное сырье* – не более 2 %.

Минеральная примесь*.Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье:*сумма полисахаридов и свободных сахаров в пересчете на глюкозу–не менее 10 %.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих через сито с отверстиями размером 0,5 мм. Около 2,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 40 мл воды и 4 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане в течение 30 мин. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры под струей холодной воды и процеживают через 5 слоев марли в мерную колбу вместимостью 100 мл. Остатки сырья в колбе промывают 10 мл воды. Марлю с остатками сырья помещают в ту же колбу с сырьем и экстракцию повторяют еще один раз указанным выше способом. Полученное извлечение процеживают через 5 слоев марли в ту же мерную колбу, марлю промывают, доводят объем извлечения водой до метки и перемешивают (раствор А).

В коническую колбу вместимостью 50 мл помещают 10,0 мл раствора А, прибавляют по каплям натрия гидроксида раствор 40 % до получения раствора с pH 4,0–4,5. Раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр (раствор Б), отбрасывая первые 10–15 мл фильтрата.

В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 2,5 мл пикриновой кислоты раствора 1 % и 7,5 мл натрия карбоната раствора 20 %,

перемешивают. В эту же мерную колбу помещают 5,0 мл раствора Б и колбу с содержимым нагревают на водяной бане в течение 10 мин. Затем мерную колбу охлаждают до комнатной температуры под струей холодной воды, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (раствор В).

В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2,5 мл пикриновой кислоты раствора 1 %, 7,5 мл натрия карбоната раствора 20 %и 5 мл воды, помещенных в мерную колбу вместимостью 100 мл. Мерную колбу с содержимым нагревают на водяной бане в течение 10 мин, после чего охлаждают до комнатной температуры под струей холодной воды, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Оптическую плотность раствора В измеряют относительно раствора сравнения на спектрофотометре при длине волны 470 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Содержание суммы полисахаридов и свободных сахаров в пересчете на глюкозу в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 50 \cdot 100 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 10 \cdot 5 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 1000000}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора В;

$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса глюкозы с пикриновой кислотой при длине волны 470 нм, равный 273;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Мелиссы лекарственной трава	**ФС.2.5.0084.18**
Melissae officinalis herba	**Взамен ФС 42-3645-98**

Собранная в фазу бутонизации, начала цветения и цветения высушенная трава многолетнего культивируемого травянистого растения мелиссы лекарственной - *Melissa officinalis* L., сем. яснотковых – *Lamiaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Верхние части стеблей длиной до 35 см с супротивными черешковыми листьями, бутонами или цветками, отдельные листья, цветки, куски стеблей. Листья скрученные, тонкие, яйцевидные с клиновидным основанием, с городчатым краем и перистым жилкованием, слегка опушенные. Стебли четырехгранные, продольно-желобчатые, слабоопушенные, с рыхлой серовато-белой сердцевиной, толщиной до 3 мм. Цветки и бутоны в ложных мутовках в пазухах верхних листьев. Прицветники эллиптические, заостренные или продолговатые, чашечка двугубая, опушенная, с плоской верхней губой. Венчик 13-15 мм длины, в полтора-два раза длиннее чашечки, двугубый, с плоской двураздельной верхней губой и трехраздельной нижней. Тычинок 4, две из которых короче других.

Листья зеленые, серовато-зеленые, иногда зеленовато-коричневые, стебли от светло-зеленого до зеленовато-серого цвета, на изломе серовато-белые. Венчик желтовато-белый.

Запах слабый, характерный, вкус водного извлечения слегка горьковатый.

Измельченное сырье. Смесь кусочков стеблей, листьев, цветков и бутонов различной формы, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) должны быть видны кусочки листьев зеленого, серовато-зеленого или зеленовато-коричневого цвета; черешков, стеблей серовато-зеленого или светло-зеленого цвета, редко серовато-зеленой или коричневатой чашечки и желтовато-белого венчика; кусочки стеблей часто расщеплены в продольном сечении и имеют желтовато-белую губчатую сердцевину. На фрагментах листовых пластинок заметны многочисленные темно-коричневые блестящие округлые образования (эфирномасличные железки), беловатые волоски, особенно многочисленные на кусочках мелких молодых листьев.

Цвет от зеленого до зеленовато-коричневого с серовато-зелеными, светло-зелеными, светло-коричневыми, коричневыми, коричневато-белыми, желтовато-белыми вкраплениями.

Запах слабый, характерный, вкус водного извлечения слегка горьковатый.

Порошок. Кусочки стеблей, листьев, цветков и бутонов различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

Цвет от зеленого до зеленовато-коричневого с серовато-зелеными, светло-зелеными, светло-коричневыми, коричневыми, коричневато-белыми, желтовато-белыми вкраплениями.

Запах слабый, характерный, вкус водного извлечения слегка горьковатый.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье, измельченное сырье.* При рассмотрении листа с поверхности должны быть видны клетки верхнего эпидермиса, стенки клеток извилистые. Клетки нижнего эпидермиса мельче с более извилистыми стенками. Устьичный комплекс на обеих сторонах листа диацитного типа.

Клетки эпидермиса по жилке вытянутой формы, угловатые, с заметно четковидно-утолщенной клеточной стенкой. На нижней стороне листовой пластинки в небольших углублениях находятся эфирномасличные железки. Крупная головка железки состоит из 8-ми радиально расположенных

выделительных клеток и одноклеточной короткой ножки. Изредка встречаются железистые волоски на короткой ножке, состоящей из одной реже трех клеток. Головка волоска овальная, как правило, состоит из двух клеток.

По поверхности жилок и по краю листа встречаются длинные 3-х, 6-ти клеточные простые волоски. Клетки волосков толстенные с бородавчатой кутикулой.

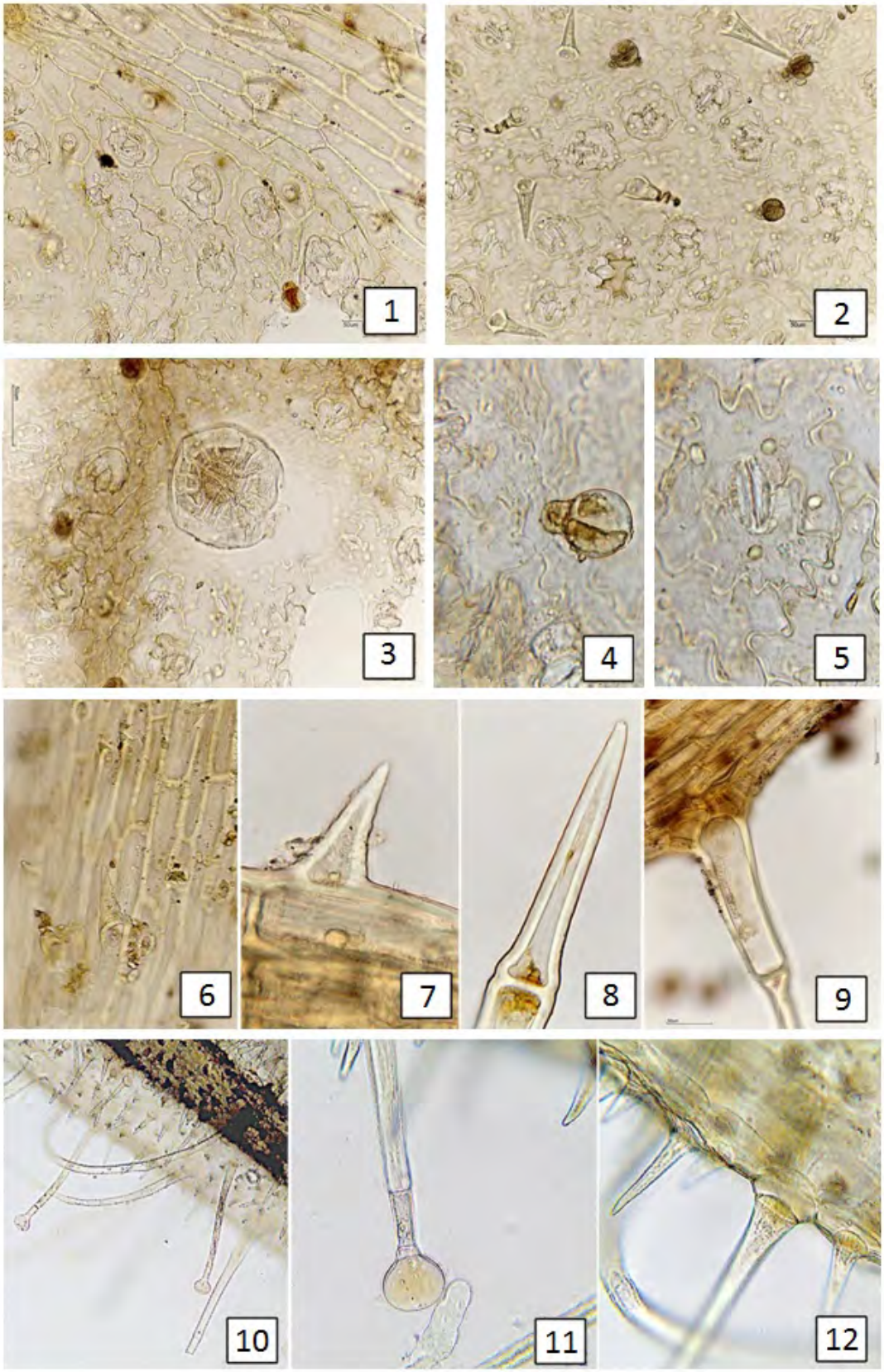


Рисунок – Мелиссы лекарственной трава.
1 – эпидермис листа над жилкой (верхняя сторона листа)(40×), 2 – эпидермис листа пластинки (нижняя сторона листа)(40×), 3 – лист мелиссы: крупная желёзка (400×), 4 – лист мелиссы: мелкий головчатый волосок с двух клеточной головкой (1000×), 5 – эпидермис нижней стороны листа:

диацитное устьице (1000×); 6 – опушение по жилке листовой пластинки: клетки эпидермы над жилкой, 7 – опушение по жилке листа: простой одноклеточный волосок, 8 – опушение по жилке листа: верхушечная клетка простого многоклеточноговолоска;9 – опушение по жилке листа: основание простого многоклеточного волоска; 10 – общий вид железистого волоска (100×), 11 – железистая головка (400×), 12 – клетка основания железистого волоска (400×).

Поверхность листа покрыта мелкими одноклеточными сосочковидными волосками, конусовидными по форме, с бородавчатой кутикулой.

По всей поверхности листовой пластинки, вдоль жилок, локализованы длинные железистые волоски. Ножка волоска многоклеточная (2-4 клетки) с гладкой кутикулой. Головка одноклеточная, булавовидной формы, с окрашенным в светло-коричневый цвет протопластом.

При рассмотрении препаратов венчика цветка должны быть видны клетки эпидермиса венчика с сильно извилистыми стенками. Для фрагментов венчика характерны также волоски шлангообразной или пальцевидной формы, 1-3-клеточные, покрытые шероховатой кутикулой, иногда со спавшимися клетками. Железистые волоски на одноклеточной ножке с шаровидной одноклеточной головкой, реже встречаются волоски с шаровидной головкой на длинной одно-трехклеточной ножке.

При рассмотрении «давленого» препарата стебля должны быть видны прямоугольно вытянутые клетки эпидермиса с прямыми стенками и устьица диацитного типа. На поверхности встречаются мелкие одноклеточные сосочковидные и конусовидные волоски с бородавчатой кутикулой, а также головчатые волоски с одноклеточной шаровидной головкой на короткой одноклеточной ножке; толстостенные механические волокна; проводящие пуски представлены спиральными сосудами.

Порошок. При рассмотрении порошка должны быть видны фрагменты эпидермиса листьев, клетки которого имеют извилистые стенки и устьица диацитного типа; эфирномасличные железки округлой формы с 8 (реже 6) радиально расположенными выделительными клетками, многочисленные во-

лоски 2-х типов: простые – от мелких одноклеточных сосочковидных и конусовидных, до очень крупных многоклеточных, как бородавчатых, так и гладкостенных (у крупных волосков часто одна или несколько спавшихся клеток) и головчатых – в большом количестве мелкие с одноклеточной шаровидной головкой на длинной одно-трехклеточной ножке; такие же волоски встречаются на фрагментах чашечки и венчика. Клетки эпидермиса венчика с сильно извилистыми стенками. Для венчика характерны также волоски шлангообразной или пальцеобразной формы, 1-3 клеточные, покрытые штриховатой кутикулой, иногда со спавшимися клетками. При рассмотрении «давленых» микропрепаратов должны быть видны многочисленные фрагменты листовых пластинок зеленого цвета, жилок листа, длинных кроющих и головчатых волосков.

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) хлорогеновой кислоты. 0,02 г СО хлорогеновой кислоты растворяют в 25 мл спирта 70 %. Срок годности раствора 3 месяца при хранении в хорошо укупоренной упаковке, в прохладном защищенном от света месте.

Раствор стандартного образца (СО) лютеолин-7-О-гикозида. 0,1 г СО лютеолин-7-О-гликозида растворяют при нагревании в 100 мл спирта 70 %. Срок годности раствора 3 месяца.

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 20 мкл (0,02 мл) испытуемого раствора (см. раздел «Количественное определение» приготовление раствора А), рядом – 10 мкл (0,01 мл) раствора СО лютеолин-7-О-гликозида и 10 мкл раствора СО хлорогеновой кислоты. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в хроматографическую камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 1 ч смесью растворителей: хлороформ – спирт 96 % – вода (26:16:3) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % от линии старта пластинки, ее

вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и сразу просматривают в УФ – свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО лютеолин-7-О-гликозида должна обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией желтовато-коричневого цвета, на хроматограмме раствора СО хлорогеновой кислоты – зона адсорбции с флуоресценцией сине-голубого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться доминирующая зона адсорбции с флуоресценцией сине-голубого цвета примерно на уровне зоны адсорбции СО лютеолин-7-О-гликозида, а также зона адсорбции с флуоресценцией желтовато-коричневого цвета на уровне зоны адсорбции СО лютеолин-7-О-гликозида и зона адсорбции с флуоресценцией сине-голубого цвета на уровне зоны адсорбции СО хлорогеновой кислоты; допускается обнаружение других зон адсорбции (фенольные соединения).

Затем пластинку обрабатывают раствором диазореактива и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО лютеолин-7-О-гликозида должна обнаруживаться зона адсорбции коричневого цвета, на хроматограмме раствора СО хлорогеновой кислоты – также зона адсорбции коричневого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться доминирующая зона адсорбции коричневого цвета примерно на уровне зоны адсорбции СО лютеолин-7-О-глюкозида, а также зона желтовато-коричневого цвета на уровне зоны адсорбции СО лютеолин-7-О-гликозида и зона адсорбции коричневого цвета на уровне зоны адсорбции СО хлорогеновой кислоты; допускается обнаружение других зон адсорбции (фенольные соединения).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье* – не более 12 %; *измельченное сырье, порошок* – не более 12 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 12 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 3 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, - не более 5 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 17 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, - не более 5 %. *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 10 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм – не более 10 %.

Посторонние примеси

Стеблей (в том числе отделенных при анализе). *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 50 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 2 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 1 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье,*

порошок: сумма фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту – не менее 2,0 %.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу с притертой пробкой вместимостью 100 мл, прибавляют 40 мл спирта 70 % и взвешивают с погрешностью ± 0,01 мл. Колбу с содержимым присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 1 ч. Затем содержимое колбы охлаждают до комнатной температуры и взвешивают, при необходимости доводят спиртом 70 % до первоначальной массы. Содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр с красной полосой.

1,0 мл фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор А).

5 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б – испытуемый раствор).

Оптическую плотность испытуемого раствора Б измеряют на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 326 нм относительно спирта 96 %.

Содержание суммы фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту и абсолютно сухое сырье в процентах (Х) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 40 \cdot 25 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot 5 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 500000}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;

$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения розмариновой кислоты при длине волны 326 нм, равный 500;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Миндаля сладкого семена **ФС.2.5.0085.18**

Amygdali dulcis semen **Взамен ГФ X ст. 603**

Собранные в период плодоношения зрелые очищенные от деревянистой косточки семена культивируемого миндального дерева - *Amygdalus communis* L. *var. dulcis DC*., сем. розоцветных - Rosaceae.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки*. Цельное сырье.* Семена яйцевидной формы, немного сплюснуты с боков; один конец семени заостренный, другой - округленный и несколько утолщенный. Семена обычно выпуклые с обеих сторон, но встречаются также выпукло-вогнутые (в случае развития в плоде двух семян). Длина семени до 2 см, ширина до 1,2 см, толщина до I *см.* Поверхность семян покрыта тусклой шероховатой светло-бурой или темно-бурой кожурой. Вблизи острого конца семени начинается семяшов, который тянется в виде тонкого валика по узкой стороне семени к широкому концу, где оканчивается халазой; халаза в виде темноокрашенного пятна заметна лучше с внутренней стороны кожуры, от нее расходятся радиально тонкие сосуды.

После погружения миндаля в горячую воду на 1-2 мин семенная кожура легко снимается вместе с остатками эндосперма, обнаруживая две белые, блестящие, легко распадающиеся семядоли; у заостренного конца семени они соединены с корешком зародыша, а между ними находится почечка. Семена приятного, сладкого, маслянистого вкуса; запах отсутствует.

***Микроскопические признаки**. Цельное сырье.* Готовят микропрепараты семенной кожуры с поверхности и поперечные срезы семени.

При рассмотрении микропрепарата семенной кожуры с поверхности должен быть виден эпидермис, имеющий гетерогенное строение, состоящий из двух типов клеток – полигональных тонкостенных и каменистых клеток. Каменистые клетки округло- или овальнополигональной формы, светло коричневого цвета, чаще уплощенные, размером 50 – 120 мкм, клеточные стенки с разной степенью утолщенности и пронизаны многочисленными порами.

На поперечном срезе семени должна быть видна семенная кожура, сросшаяся с мало диагностичным остатком эндосперма, состоящим из 1-2 слоев спавшихся клеток. Основная часть микропрепарата представлена полигональными или слегка радиальноудлиненными клетками семядолей зародыша, в которых видны капли жирного масла и алейроновые зерна.

Видны участки ткани семядолей зародыша, содержащей жирное масло в виде многочисленных бесцветных капель и мелкие алейроновые зерна; обрывки желто-коричневой семенной кожуры, во внутренних слоях которой видны каменистые клетки округлой или овальной формы размером 50 – 120 мкм с разной степенью утолщенности пористых клеточных стенок; участки проводящих пучков с лестничными и сетчатыми сосудами.

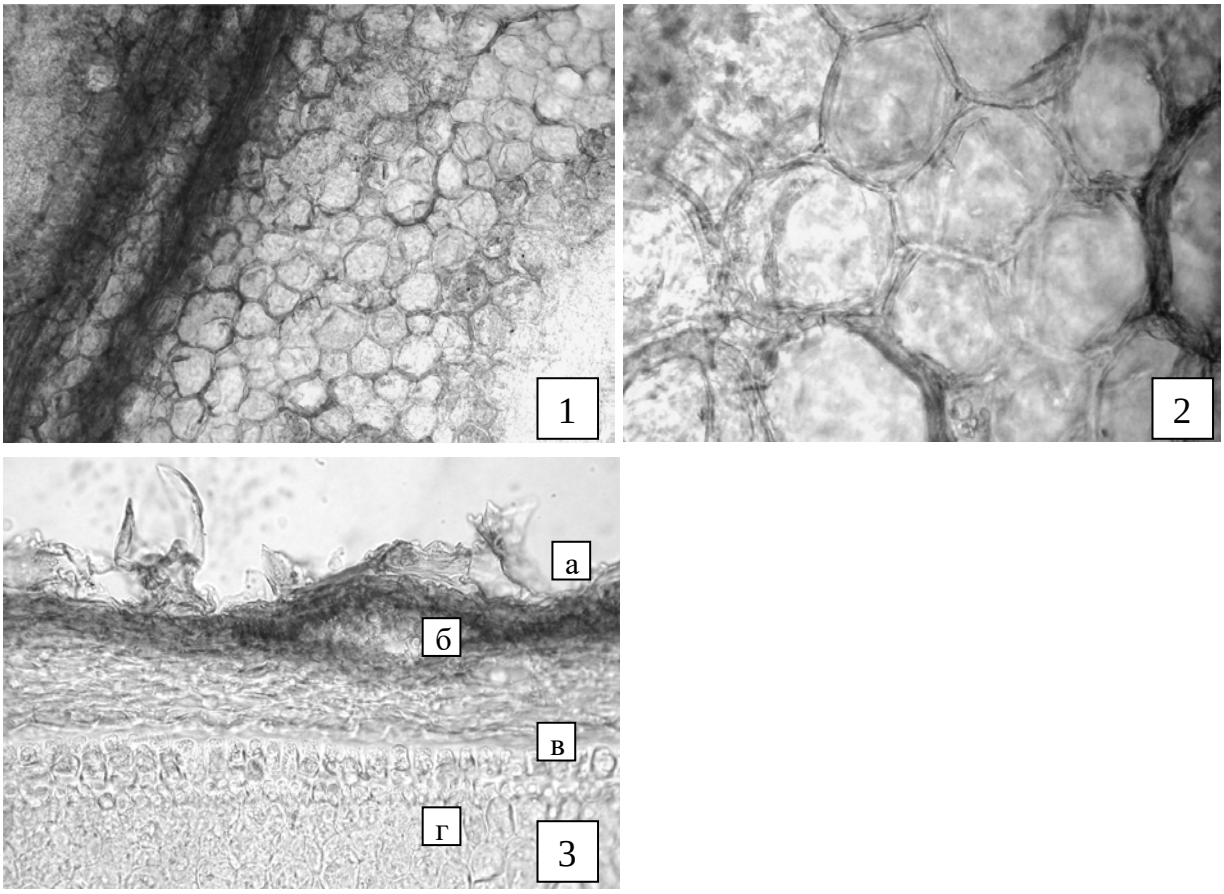


Рисунок 1 - Миндаля сладкого семена
1 - эпидермис и проводящие элементы (100×); 2 - эпидермис (400×); 3 - поперечный срез семени (400×): а - разрушенные клетки эпидермиса семенной кожуры, б - проводящие элементы (сосуды) семенной кожуры, в - – клетки эндосперма, г - клетки семядолей зародыша.

Возможные примеси семян других растений. У семян абрикоса - *Armeniaca vulgaris* Lam. - клетки эпидермиса при рассмотрении с поверхности, как и у миндаля на месте халазы, расположены прерванными группами, но они значительно мельче - около 60 *мкм.* У семян персика - *Persica vulgaris* Mill. - эти клетки образуют на месте халазы сплошной слой и отличаются утолщенной колпачковидной верхней стенкой.

Определение основных групп биологически активных веществ

Качественные реакции

1. 1 мл масла жирного, полученного при количественном определении, взбалтывают с 0,2 мл охлажденной смеси равных объемов воды, серной кислоты концентрированной и азотной кислоты дымящей; должна образовываться масса светло-желтого цвета (липохромы); не должно появляться красного окрашивания (семена абрикоса или персика).

2. Около 3 г семян помещают в фарфоровую ступку, растирают, прибавляют 5 мл воды; не должно ощущаться запаха бензальдегида (амигдалин).

3. Около 3 г семян помещают в фарфоровую ступку, растирают, прибавляют 0,5 мл серной кислоты концентрированной; не должно появляться красного окрашивания (амигдалин).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье* - не более 6,5 %.

Зола общая. *Цельное сырье* - не более 4 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье* – не более 1,0 %.

Посторонние примеси

Недозрелые семена. *Цельное сырье* - не более 1 %.

Семена с присохшей кожурой, камедью. *Цельное сырье* - не более 3,0 %.

Скорлупа семян. *Цельное сырье* - не более 1 %.

Семена, поврежденные вредителями. *Цельное сырье* - не более 1,5 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье* - не более 5,0 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье* - не более 1,0 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье*: масла жирного не менее 40 %.

Около 100-150 г сырья помещают в фарфоровую чашку и подсушивают в течение 1 ч при температуре 100-105 °С. Подсушенное сырье* измельчают в фарфоровой ступке или измельчителе, ступка перед работой должна быть промаслена. Около 10,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в пакет из фильтровальной бумаги и помещают в экстрактор аппарата Сокслета с рабочим объемом около 250 мл, эстрагируют 150 мл этилового эфира в течение 18 час. Патрон вынимают из экстрактора, слегка подсушивают под тягой, осторожно раскрывают и шрот количественно переносят в фарфоровую ступку. К шроту прибавляют около 5 г стеклянного порошка и тщательно растирают, затем количественно переносят в тот же патрон. Патрон помещают в экстрактор, в котором велась предварительная экстракция и продолжают экстракцию еще 6 ч. Затем определяют полноту извлечения жира и в случае необходимости продолжают экстракцию еще 1-2 ч. Конец экстракции устанавливают по отсутствию жира при пробе на полноту экстракции. Для этого, отсоединив от колбы экстрактор, наносят одну каплю раствора на часовое стекло. После испарения эфира на стекле не должно оставаться жирного пятна.

По окончании экстракции отгоняют эфир и сушат масло в сушильном шкафу при температуре 100-105 °С до постоянной массы. Первое взвешивание производят через 1-1,5 ч, последующие – через 30 мин. В случае повторяющегося дважды увеличения массы высушивание прекращают и для расчета принимают наименьшую массу.

*Одновременно с определением содержания масла жирного определяют влажность измельченного подсушенного сырья.

Содержание масла жирного в подсушенном сырье в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(m \cdot m_1) \cdot 100 \cdot 100}{m_2 \cdot (100 - W)},$$

где m – масса колбы с маслом, г;
m_1 – масса пустой колбы;
m_2 – навеска подсушенного сырья, г;
W – влажность измельченного подсушенного сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Можжевельника обыкновенного плоды ФС.2.5.0028.15

Juniperi communis fructus

Собранные в фазу полного созревания, высушенные плоды (шишко-ягоды) дикорастущих кустарников можжевельника обыкновенного – *Juniperus communis* L. , сем. кипарисовых – *Cupressaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырьё.* Плоды шишко-ягоды 6 - 10 мм в диаметре, цилиндрической формы, шаровидные, иногда овальные или эллиптические, часто по бокам вдавленные, гладкие, блестящие, реже матовые. Плоды образованы 3 сросшимися семенными плодолистиками. На верхушке заметен трёхлучевой шов, образованный сросшимися чешуевидными мегаспорофиллами, иногда они с выдающимися кончиками, отвёрнутыми назад; при основании плода заметны под лупой (10×) 2 трёхлистные мутовки из светло-коричневых чешуек (неоплодотворённые чешуевидные мегаспорофиллы шишки). В мякоти находится 3 (иногда 1 или 2) семени. Семена овально-продолговатые, тупо-трехгранные, выпуклые снаружи и плоские на соприкасающихся сторонах, длиной 4 – 5 мм. Кожура семени твёрдая. Цвет плодов снаружи почти черный или фиолетовый с коричневым оттенком, иногда с серо-голубым восковым налетом. Цвет мякоти зеленовато-коричневый, цвет семян желтовато-коричневый. Запах характерный. Вкус водного извлечения сладковатый, пряный.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении препарата кожуры с поверхности видны клетки эпидермиса округло-

многоугольные с утолщёнными стенками. В боковых стенках имеются поры. Наружные стенки клеток значительно утолщены слоем кутикулы.

На поперечном срезе видно, что под эпидермисом находятся 2 ряда клеток гиподермы, которые крупнее эпидермальных. Клетки эпидермиса и гиподермы заполнены красновато-коричневым содержимым. Мякоть плода состоит из тонкостенных паренхимных клеток овальной формы, на некоторых имеются выросты. В клетках паренхимы расположены идиобласты и вместилища с эфирным маслом. Идиобласты – крупные с толстыми стенками. Вместилища эфирного масла округлой формы, схизолизигенного типа, разного диаметра, крупные, особенно около семян. Среди паренхимы проходят проводящие пучки с характерной склеренхимной обкладкой и тонкостенными волокнистыми элементами. Ксилема проводящих пучков состоит из сосудов 3 типов: с окаймлёнными порами, окаймлённые и спиральные, только спиральные. Внутренняя оболочка шишко-ягоды содержит 10 слоев каменистых клеток. Склереиды имеют среднюю степень лигнификации.

При рассмотрении «давленого» препарата плода видны фрагменты эпидермиса, состоящего из округло-многоугольных клеток с толстыми пористыми стенками, часто с остатками прилегающего слоя гиподермы красновато-коричневого цвета; редко – фрагменты эпидермиса с устьицами и сосочковидными выростами (встречаются только в области бороздок на верхушке плода); клетки паренхимы округлой или неправильной формы из-за выростов; крупные клетки паренхимы округлой, овальной или неправильной формы, толстостенные с хорошо заметными щелевидными порами; эфирномасличные вместилища − мешковидные образования от веретенообразной до округлой формы, с прозрачным или белесым, мягким или затвердевшим смолистым содержимым; проводящие пучки, включающие различные элементы: трахеиды с окаймленными порами, мелкие спиральные сосуды, элементы переходной формы − с окаймленными

порами и спиралями, волокна со щелевидными порами, редко встречаются перегородчатые трахеиды.

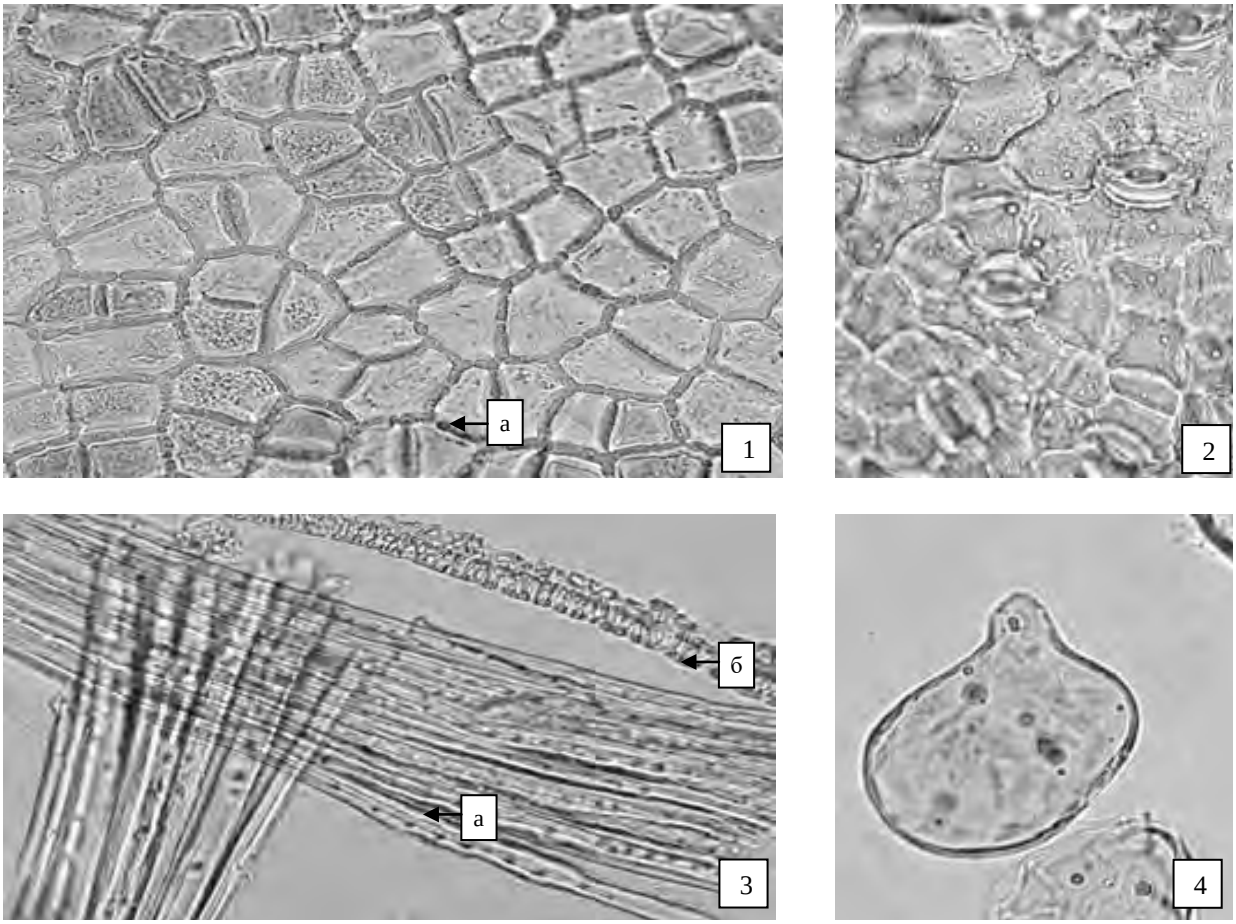


Рисунок – Можжевельника обыкновенного плоды.

1 – многоугольные клетки эпидермиса с пористыми стенками (200×), 2 – фрагмент эпидермиса с устьицами в области бороздки на верхушке плода (200×), 3 – группы сосудов с окаймленными порами (а) и спиральные сосуды (б) (200×), 4 – клетка паренхимы с выростом (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) судана III. Около 0,005 г судана III растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор СО судана красного G. Около 0,0025 г судана красного G растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора 6 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около 1,0 г сырья, измельченного до отсутствия цельных плодов,

помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, приливают 10 мл спирта 96 % и нагревают с обратным холодильником на водяной бане в течение 10 мин. После охлаждения до комнатной температуры извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 10 мкл испытуемого раствора и по 5 мкл раствора СО судана красного G и раствора СО судана III. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин смесью растворителей гексан – этилацетат – муравьиная кислота безводная (15:5:0,1), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 - 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры и сушат до удаления следов растворителей. Пластинку обрабатывают анисового альдегида раствором уксуснокислым в этаноле, выдерживают в сушильном шкафу при 100 – 105 ºС в течение 2 – 3 мин и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме растворов СО судана III и СО судана красного G должны обнаруживаться: зона судана красного G розово- или фиолетово-красного цвета и над ней зона судана III фиолетово- или сине-красного цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться: зона адсорбции фиолетово-розового цвета ниже зоны адсорбции судана красного G; интенсивная сине-фиолетового цвета зона адсорбции выше зоны адсорбции судана красного III и над ней интенсивная серо-синего цвета зона адсорбции; допускается обнаружение других зон адсорбции (терпеноиды).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырьё* – не более 20 %.

Зола общая. *Цельное сырьё* – не более 5 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырьё* – не более 1 %.

Посторонние примеси

Плоды, которые приобрели темно-коричневую окраску. *Цельное сырьё* – не более 9,5 %.

Зелёные плоды*. Цельное сырьё* – не более 0,5 %.

Органическая примесь (части других неядовитых растений и хвои можжевельника). *Цельное сырьё* – не более 1 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырьё* – не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырьё:* эфирного масла – не менее 0,5 %.

Определение эфирного масла проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 2, из навески 15,0 г сырья, измельченного до отсутствия цельных плодов, объем воды 300 мл, время перегонки - 2 ч).

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Мяты перечной листья **ФС.2.5.0029.15**

Menthae piperitae folia

Собранные в фазу цветения механизированным способом и обмолоченные, высушенные листья многолетнего культивируемого травянистого растения мяты перечной – *Mentha piperita* L., сем. яснотковых – *Lamiaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки.*Цельное сырье.*Различной формы кусочки листьев, стеблей, реже – цветков и бутонов, размером 10 мм и более.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны: фрагменты листовых пластинок (у некоторых сохранился пильчатый край с неровными острыми зубцами), черешков, редко встречаются элементы чашечки и венчика. На поверхности листовых пластинок и чашечек видны многочисленные округлые блестящие железки от золотисто-желтого до темно-коричневого цвета, снизу по жилкам заметны слегка прижатые волоски беловатого цвета. На стеблях волоски немногочисленные, железки встречаются очень редко.

Цвет листьев от светло-зеленого до темно-зеленого; стеблей– от зеленого до темно-зеленого или зеленовато-коричневого, зеленовато-фиолетового;бутоны и цветки с чашечками –от светло-зеленого до зеленовато-коричневого и венчиками –от бледно-фиолетового до коричневато-фиолетового цвета. Запах сильный, характерный.Вкус водного извлечения жгучий, холодящий.

Измельченное сырье. Смесь кусочков листьев, стеблей, редко – цветков и бутонов, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны: фрагменты листовых пластинок светло-зеленых, зеленых, редко коричневато-зеленых, черешков и стеблей от зеленого до коричневато-зеленого или светло-коричневого цвета, иногда с фиолетовым оттенком, часто продольно-расщепленные с белой или коричневато-белой губчатой сердцевиной, реже встречаются элементы чашечки, часто с зеленовато-фиолетовыми зубцами и бело-розового, бело-фиолетового, коричневато-белого или коричневого венчика; на поверхности листовой пластинки видны многочисленные округлые блестящие железки от золотисто-желтого до темно-коричневого цвета, снизу по жилкам могут располагаться слегка прижатые волоски беловатого цвета; на фрагментах стеблей волоски немногочисленные, железки встречаются очень редко; изредка встречаются очень мелкие коричневые или светло-коричневые округлые семена.

Цвет от светло-зеленого до темно-зеленого или зеленовато-коричневого с зеленовато-фиолетовыми, серовато-белыми, желтовато-белыми, коричневато-белыми, бледно-фиолетовыми, коричневато-фиолетовыми, фиолетовыми, черными вкраплениями. Запах сильный, характерный. Вкус водного извлечения жгучий, холодящий.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье, измельченное сырье.* При рассмотрении микропрепаратов листа с поверхности с верхней и нижней стороны видны клетки эпидермиса с сильно извилистыми стенками, устьица с 2околоустьичными клетками, расположенными перпендикулярно продольной оси устьица (диацитный тип). Возможно наличие простых 2–4-клеточных волосков с бородавчатой кутикулой, в основном по жилкам и по краю листа. По всей поверхности имеются мелкие головчатые волоски, состоящие из короткой одноклеточной ножки и одноклеточной обратнояйцевидной головки. В небольших углублениях с обеих сторон листа видны эфирномасличные железки, они имеют короткую ножку и округлую

головку, состоящую из 8, редко 6 радиально расположенных выделительных клеток (не всегда ясно заметных). При рассмотрении чашелистиков и венчика с поверхности видны клетки эпидермиса с сильно извилистыми стенками; эпидермис лепестков со складчатой кутикулой, а клетки внутреннего эпидермиса имеют сосочковидные выросты. Устьица редкие, диацитного типа, расположены на чашелистиках с наружной стороны. На поверхности чашелистиков и венчика, и по краю чашелистиков видны волоски и железки такие же, как на листьях.

При рассмотрении «давленого» препарата стебля видны прямоугольные вытянутые клетки эпидермиса с прямыми стенками, на поверхности встречаются простые головчатые волоски и эфирномасличные железки, характерные для листьев мяты; механические волокна; сосуды лестничного и спирального типа.

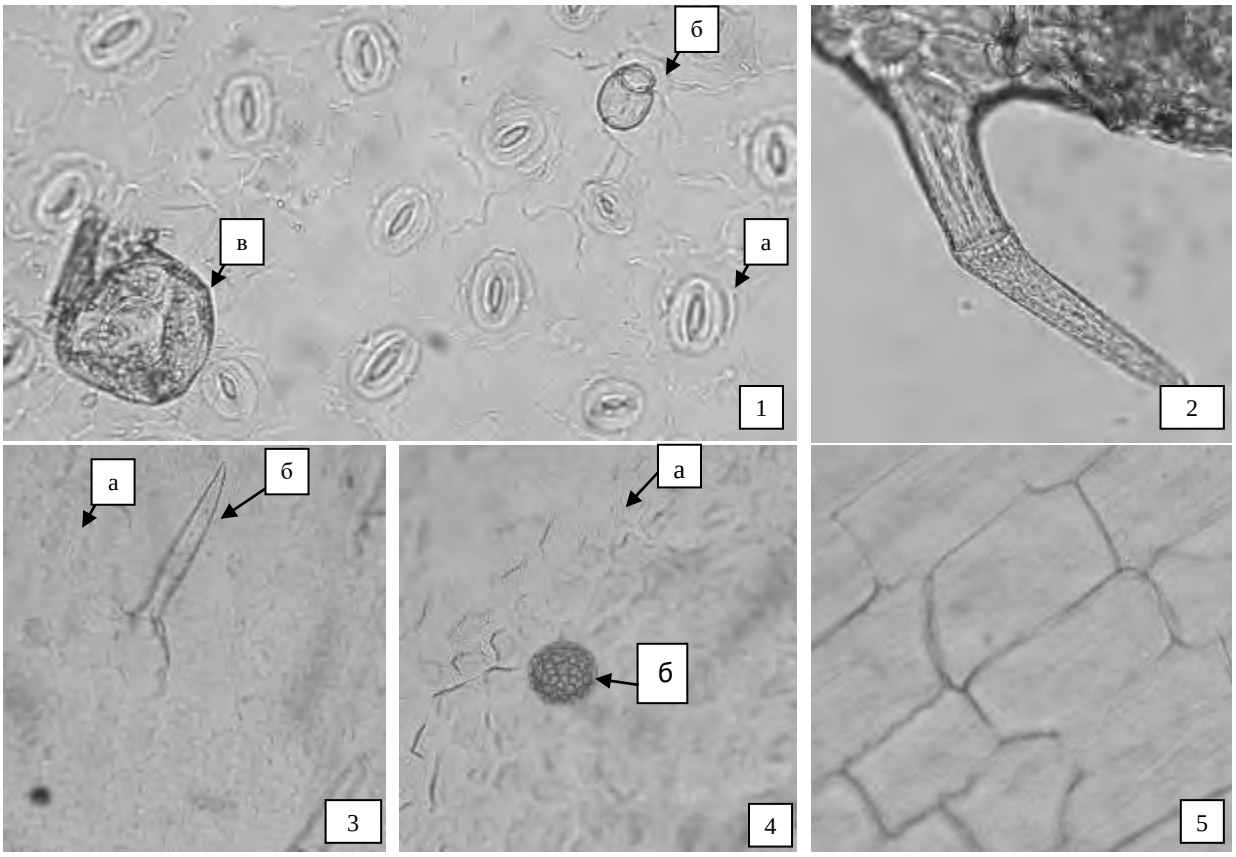


Рисунок – Мяты перечной листья.
1 – фрагмент эпидермиса листа: а – клетки эпидермиса с извилистыми стенками и устьицами диацитного типа, б – головчатый волосок, в – эфирномасличная железка (200×), 2 – простой бородавчатый волосок, (200×), 3 – фрагмент венчика: а – эпидермис с извилистыми стенками, б – простой бородавчатый волосок (200×), 4 – фрагмент венчика: а – эпидермис с сосочковидными выростами, б – пыльца (200×), 5 – фрагмент эпидермиса стебля (400×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) тимола. Около 0,01 г СО тимола растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 меспри хранениив прохладном, защищенном от света месте.

Раствор СО ментола. Около 0,01 г СО ментола (левоментола) растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 меспри хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около 1,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм,помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 5 мл дихлорметана и взбалтывают в течение 10 мин, затем извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитическойхроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 10 мкл испытуемого раствора,параллельно в одну полосу по 5 мкл раствора СО ментола и раствора СО тимола.

Пластинку с нанесенными пробами сушат, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 60 мин смесью растворителей толуол–этилацетат (95:5), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80–90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и обрабатываютанисового альдегида раствором уксуснокислым в этаноле, выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100–105 °С в течение 3–5 мин и просматривают сразу жепри дневном свете.

На хроматограмме растворовСО ментола и СО тимола должны обнаруживаться: зона адсорбции синего или фиолетового цвета (ментол) и над ней зона адсорбции СО тимола красного или оранжево-красного цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться: зона адсорбции синего, сине-зеленого, зеленого или фиолетового цвета на уровне зоны адсорбции СО ментола; зона адсорбции синего, сине-зеленого, зеленого или фиолетового цвета ниже зоны адсорбции СО ментола; зона адсорбции фиолетового цвета выше зоны СО тимола; допускается обнаружение зоны адсорбции красного или розового цвета между зонами адсорбции СО ментола и СО тимола; зоны адсорбции синего, сине-зеленого или зеленого цвета ниже зоны адсорбции СО ментола; зоны адсорбции синего, сине-зеленого или зеленого цвета выше зоны адсорбции СО тимола; зоны адсорбции коричневого цвета на линии старта и других дополнительных зон адсорбции (терпеноиды).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность.*Цельное сырье,измельченное сырье*– не более 14 %.

Зола общая.*Цельное сырь,измельченное сырье*– не более 14 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте.*Цельное сырье, измельченное сырье*– не более 6 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, –не более 5 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм, –не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм,–не более 5 %.

Посторонние примеси.

Листья, изменившие окраску (потемневшие и почерневшие).*Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 5 %.

Стебли.*Цельное сырье* – не более 10 %.

Органическая примесь.*Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3 %.

Минеральная примесь.*Цельное сырье, измельченное сырье*– не более 1 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье*:эфирного масла– не менее 1 %; суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин– не менее

0,6 %.*Измельченное сырье:* эфирного масла –не менее 0,8 %; суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин –не менее 0,6 %.

Эфирное масло.

В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 2, из навески 30,0 г сырья,измельченного до величины частиц,проходящих сквозь сито с отверстиями размером2 мм, объем воды 500 мл, время перегонки - 1 ч).

Сумма флавоноидов.

Приготовление растворов.

Раствор СО лютеолина. Около 0,01 г (точная навеска) СО лютеолина, предварительно высушенного при температуре 130–135 ºС в течение 3 ч, растворяют в 25 мл спирта 96 % в мерной колбе вместимостью 50 мл при нагревании на водяной бане, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор А СО лютеолина). Срок годности раствора не более 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

1,0 мл раствора А СО лютеолина, 2 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 % и 0,1 мл уксусной кислоты концентрированной, доведенного спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл (раствор Б СО лютеолина). Срок годности раствора не более 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм.Около 0,5 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл спирта 70 %, колбу взвешивают с погрешностью ± 0,01 г, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане в течение 1,5 ч. Колбу охлаждают до комнатной температуры и взвешивают, при необходимости доводят спиртом 70 % до первоначальноймассы. Содержимое колбы фильтруют через бумажный складчатый фильтр, отбрасывая первые 25 мл фильтрата (раствор А испытуемого раствора).

5,0 мл раствора А испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл алюминия хлорида спиртового

раствора 2 % и 0,1 мл уксусной кислоты концентрированной, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора).

Оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора измеряют через 40 мин на спектрофотометре при длине волны 400 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из5 мл раствора А испытуемого раствора и 0,1 мл уксусной кислоты концентрированной, доведенный спиртом 96 %до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО лютеолина в таких же условиях. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из1 мл раствора А СО лютеолина, 0,1 мл уксусной кислоты концентрированной,доведенный спиртом 96 %до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин и абсолютно сухое сырье в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 25 \cdot P \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot 50 \cdot 25 \cdot a \cdot 5 \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot a_0 \cdot P \cdot 40}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
$A_о$ – оптическая плотность раствора Б СО лютеолина;
a – навеска сырья, г;
$a_о$ – навеска СО лютеолина, г;
P – содержание основного вещества в СО лютеолина, %;
W – влажность сырья, %.

Допускается содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин вычислять с использованием удельного показателя поглощения комплекса лютеолина с алюминия хлоридом по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1см}^{1\%} \cdot a \cdot 5 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 50000}{A_{1см}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса лютеолина с алюминия хлоридом при длине волны 400 нм, равный 549;

a – навеска сырья, г;
W – влажность сырья, %.

Примечание. Определение эфирного масла и суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин проводят для сырья, предназначенного для производства лекарственных растительных препаратов (пачки), определение эфирного масла – для сырья, предназначенного для получения эфирного масла, настойки.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Одуванчика лекарственного корни	**ФС.2.5.0086.18**
Taraxaci officinalis radices	**Взамен ГФ XI, вып. 2, ст. 69**

Собранные в период увядания листьев, очищенные от корневой шейки, отмытые от земли и высушенные корни дикорастущего многолетнего травянистого растения одуванчика лекарственного – *Taraxacum officinale* Wigg., сем. астровых – *Asteraceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Корни стержневые, маловетвистые, цельные или изломанные, длиной 2 – 15 см, толщиной 0,3 – 3 см, продольно-морщинистые, иногда спирально-перекрученные, плотные, хрупкие. Излом неровный. В центре корня видна небольшая желтая древесина, окруженная широкой серовато-белой корой, в которой заметны (под лупой 10×) буроватые концентрические тонкие пояса млечников.

Цвет снаружи от светло-коричневого до темно-коричневого. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения горьковатый со сладким привкусом.

Измельченное сырье. При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки корней различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет серовато-белый с темно-коричневыми и желтыми вкраплениями. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения горьковатый со сладким привкусом.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении микропрепарата поперечного среза должно быть видно, что корень имеет нелучистое строение; изредка встречаются 1 – 2 широких сердцевинных луча, расположенных супротивно. Пробка тонкая, светло-коричневая. Кора широкая, состоит из крупных овальных клеток паренхимы, в которой проходят концентрические ряды, образованные группами мелких проводящих элементов – луба и млечников. Клетки паренхимы заполнены бесцветными комочками и глыбками инулина, которые легко растворяются при нагревании препарата. Млечники заполнены желтовато-коричневым содержимым. Линия камбия четкая. Древесина рассеянно-сосудистая, состоит из крупных сосудов и паренхимы, содержащей инулин.

Измельченное сырье. При рассмотрении «давленого» микропрепарата должны быть видны мелкие и крупные частицы (обычно в продольном сечении): фрагменты пробки, состоящие из многоугольных клеток с прямыми стенками (при рассмотрении с поверхности) светло-коричневого цвета; группы лестничных и сетчатых сосудов, собранные пучками или по 1 – 2; фрагменты паренхимы с секреторным каналом, образованным из эндодермы и наполненным желтым содержимым.

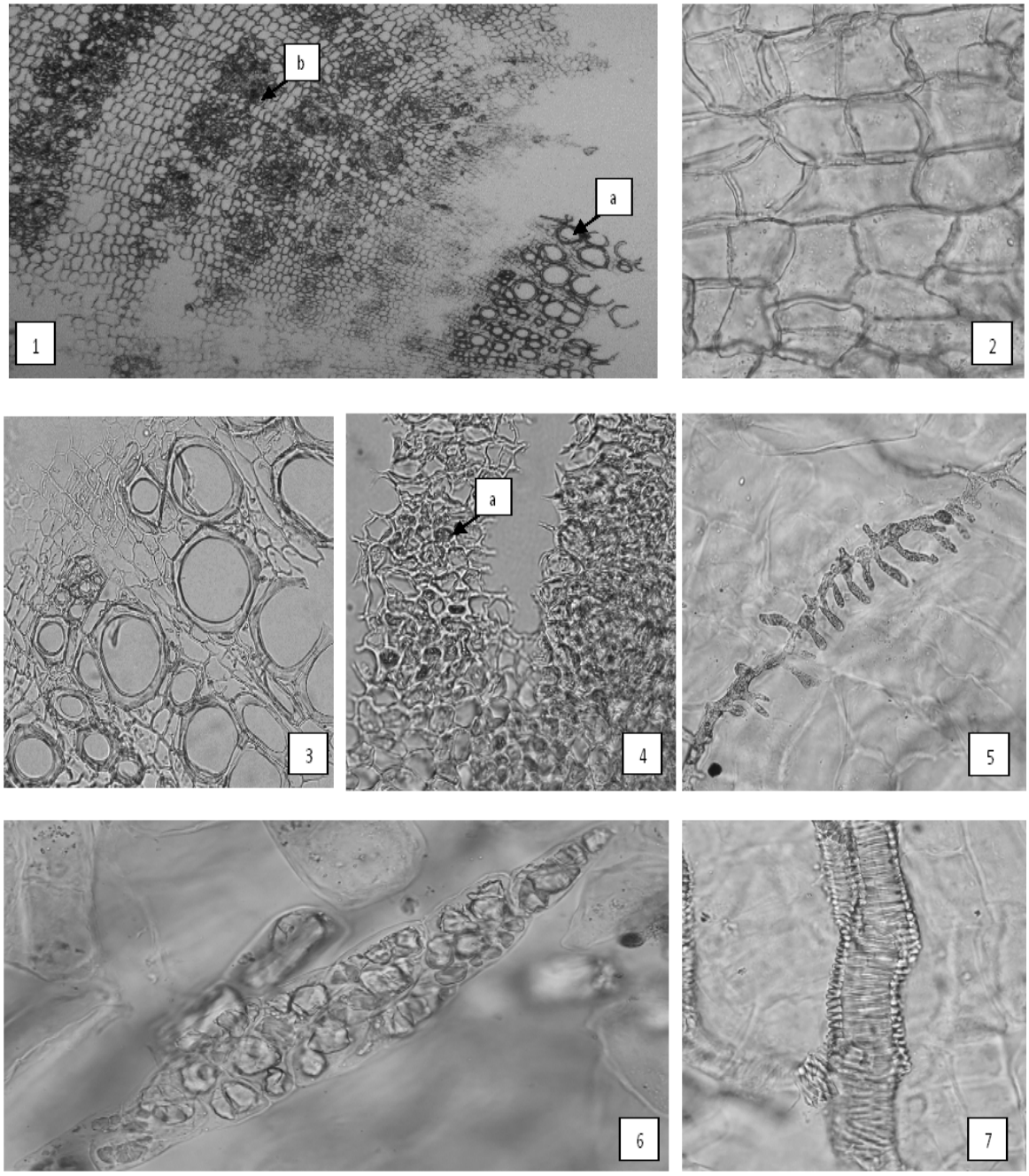


Рисунок - Одуванчика лекарственного корни

1 – фрагмент поперечного среза корня: a – сосуды древесины, b – млечники (40×), 2 – фрагмент пробки - вид с поверхности (200×), 3 – сосуды древесины - поперечный срез (200×), 4 – млечники - поперечный срез, «а», (200×), 5 – млечники – «давленый» микропрепарат (200×), 6 – глыбки инулина – «давленый микропрепарат» (200×), 7 – лестничный сосуд – «давленый» микропрепарат (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор для детектирования 1. Дифенилборилоксиэтиламина раствор спиртовой 1 %. 1,0 г дифенилборилоксиэтиламина (дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира) растворяют в 100 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 3 мес. при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор для детектирования 2. Полиэтиленгликоля (ПЭГ) 400 раствор спиртовой 5 %. 5 мл ПЭГ смешивают со 100 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 6 мес. при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор стандартного образца (СО) хлорогеновой кислоты. Около 0,005 г хлорогеновой кислоты растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 мес. при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Около 2,0 г измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл спирта 96 % и нагревают с обратным холодильником в водяной бане при температуре 60 °С в течение 10 мин. После охлаждения извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля в виде полос длиной 10 мм, шириной не более 3 мм наносят 30 мкл (0,03 мл) испытуемого раствора и параллельно 20 мкл (0,02 мл) раствора СО хлорогеновой кислоты.

Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре в течение 5 мин, помещают в камеру (выложенную изнутри фильтровальной бумагой), предварительно насыщенную в течение не менее 40 мин со смесью растворителей этилацетат – муравьиная кислота безводная – вода (80:10:10), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, пластинку вынимают из камеры и сушат до удаления следов растворителей.

Затем пластинку последовательно опрыскивают дифенилборилокси-

этиламина раствором 1 % в спирте 96 % и полиэтиленгликоля раствором 5 % в спирте 96 %, выдерживают в сушильном шкафу при 105 - 110 °С в течение 3 - 5 мин и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО хлорогеновой кислоты должна обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией голубого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться не менее трех зон адсорбции: одна зона адсорбции с флуоресценцией голубого цвета на уровне зоны СО хлорогеновой кислоты и две зоны адсорбции с флуоресценцией голубого цвета выше уровня зоны СО хлорогеновой кислоты; допускается обнаружение других зон адсорбции.

При нанесении раствора йода на коровую часть корня или порошок не должно быть синего окрашивания (отсутствие крахмала).

Соскоб корня или порошок от прибавления α - нафтола раствора 20 % спиртового и концентрированной серной кислоты должен окрашиваться в фиолетово-розовый цвет (инулин).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 14 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 8 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 4 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 10 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 10 %.

Посторонние примеси

Корней, плохо очищенных от корневых шеек и черешков листьев. *Цельное сырье* – не более 4 %;

Дряблые корни. *Цельное сырье* – не более 2 %.

Корней, изменивших свою окраску (потемневших на изломе). *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 10 %.

Органическая примесь*. Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 0,5 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 2 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье:* экстрактивных веществ, извлекаемых водой – не менее 40 %.

Определение экстрактивных веществ, извлекаемых водой, проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1, экстрагент – вода очищенная).

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Ольхи соплодия **ФС.2.5.0087.18**

Alni fructus **Взамен ГФ XI ст. 28**

Собранные поздней осенью и зимой, высушенные соплодия дикорастущих деревьев ольхи серой – *Alnus incana* (L.) *Moench* и ольхи клейкой (ольхи черной) – *Alnus glutinosa* (L.) *Gaertn*., сем. березовых – *Betulaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Яйцевидные или продолговатые соплодия ольхи («шишки») расположенные по нескольку штук на общей плодоножке или одиночные, с плодоножками либо без них, чешуйки и плоды. На твердой оси соплодия расположены многочисленные веерообразные чешуйки с утолщенным, слегка лопастным наружным краем. В пазухах чешуек находятся односеменные двукрылые сплюснутые плоды – орешки. Длина общей плодоножки до нижнего соплодия до 15 мм, длина соплодий до 20 мм, диаметр до 13 мм. Цвет соплодий и веточек темно - коричневый.

Запах слабый. Вкус водного извлечения вяжущий.

Измельченное сырье. Кусочки плодоножек, чешуек, осей соплодий различной формы и плоды - орешки, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 5 мм. Цвет от светло - коричневого до темно - коричневого.

Запах слабый. Вкус водного извлечения вяжущий.

При рассмотрении поперечного среза плода под лупой (10×) видны ось и прикрепленные к ней чешуйки, разрезанные вдоль.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* На поперечном срезе оси соплодия должны быть видны 5 - 6 сосудисто-волокнистых коллатеральных

пучков, у основания которых находится многоклеточная перимедулярная зона. Флоэма деформирована; над флоэмой располагается механическая ткань, состоящая из круглых или продолговатых клеток. На поперечном срезе чешуйки в средней части должно быть видно 5 сосудисто-волокнистых коллатеральных пучков, состоящих из ксилемы, тонкого слоя деформированной флоэмы и 3-5 рядов склеренхимы, расположенных по обеим сторонам пучка. Вокруг пучков должна быть расположена различная по размеру паренхима, клетки которой заполнены флобафеном. Чешуйки должны быть покрыты эпидермисом с кутикулой, более толстой на внешней стороне соплодий. При рассмотрении чешуйки с поверхности должны быть видны клетки эпидермиса с сильно извилистыми стенками.

Измельченное сырье. При исследовании микропрепаратов должны быть видны фрагменты эпидермиса, клетки которого имеют сильно извилистые, утолщенные стенки, и вытянуты вдоль продольной оси чешуйки; фрагменты паренхимы, клетки которой часто заполнены темно-коричневым содержимым (флобафен); группы разветвляющихся сосудисто-волокнистых пучков.

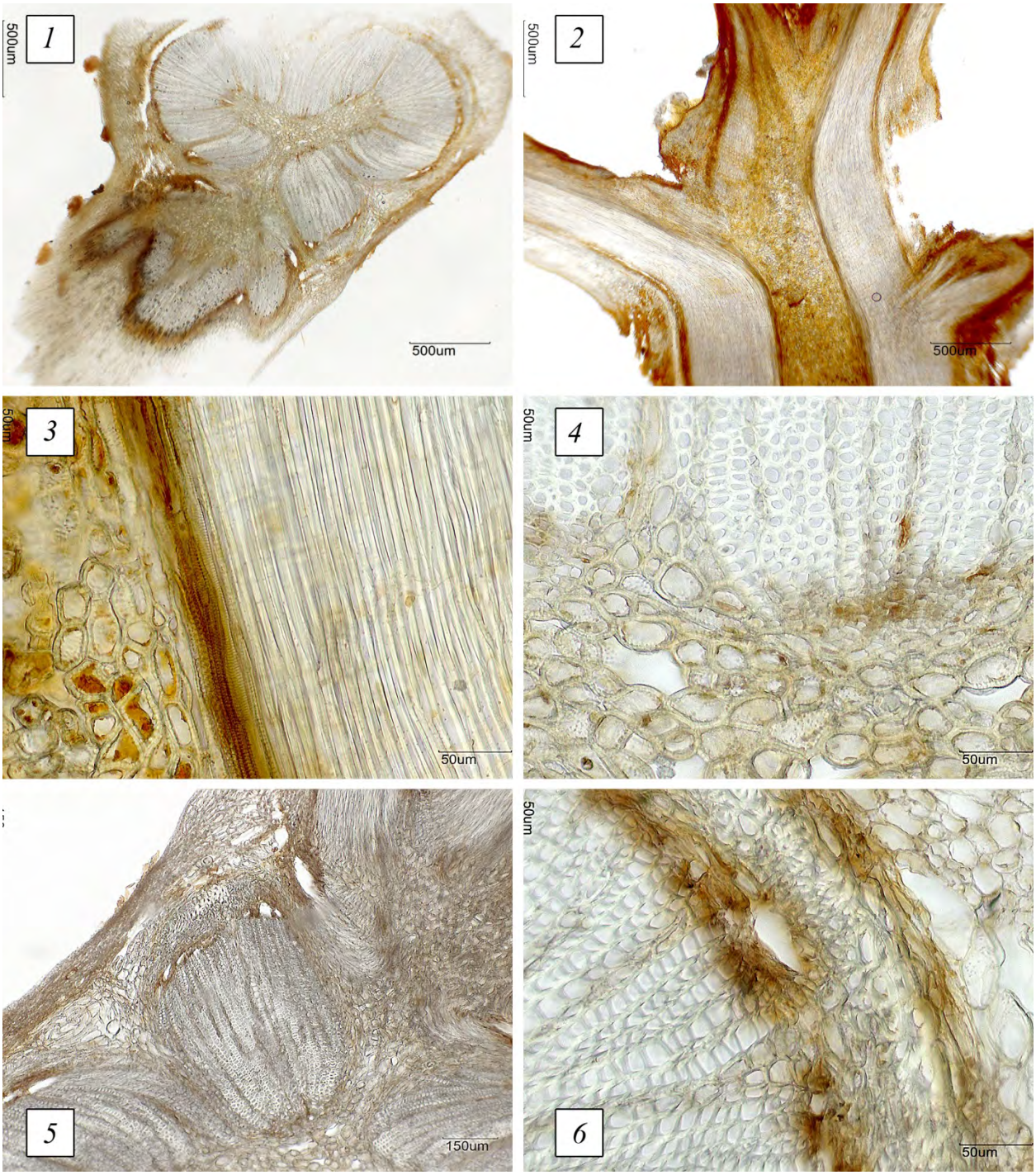


Рисунок – 1. Осевая часть соплодий ольхи серой.
1 – разно-размерные сосудисто-волокнистые коллатеральные пучки; поперечный срез (40×); 2 – пигментированные клетки сердцевины. Продольный срез (40×), 3 – перимедулярная зона пучка. Продольный срез (90×); 4 – сердцевина соплодия поперечный срез (90×); 5 – сосудисто-волокнистые коллатеральные пучки(90×); 6 – флоэмная часть пучка (90×).

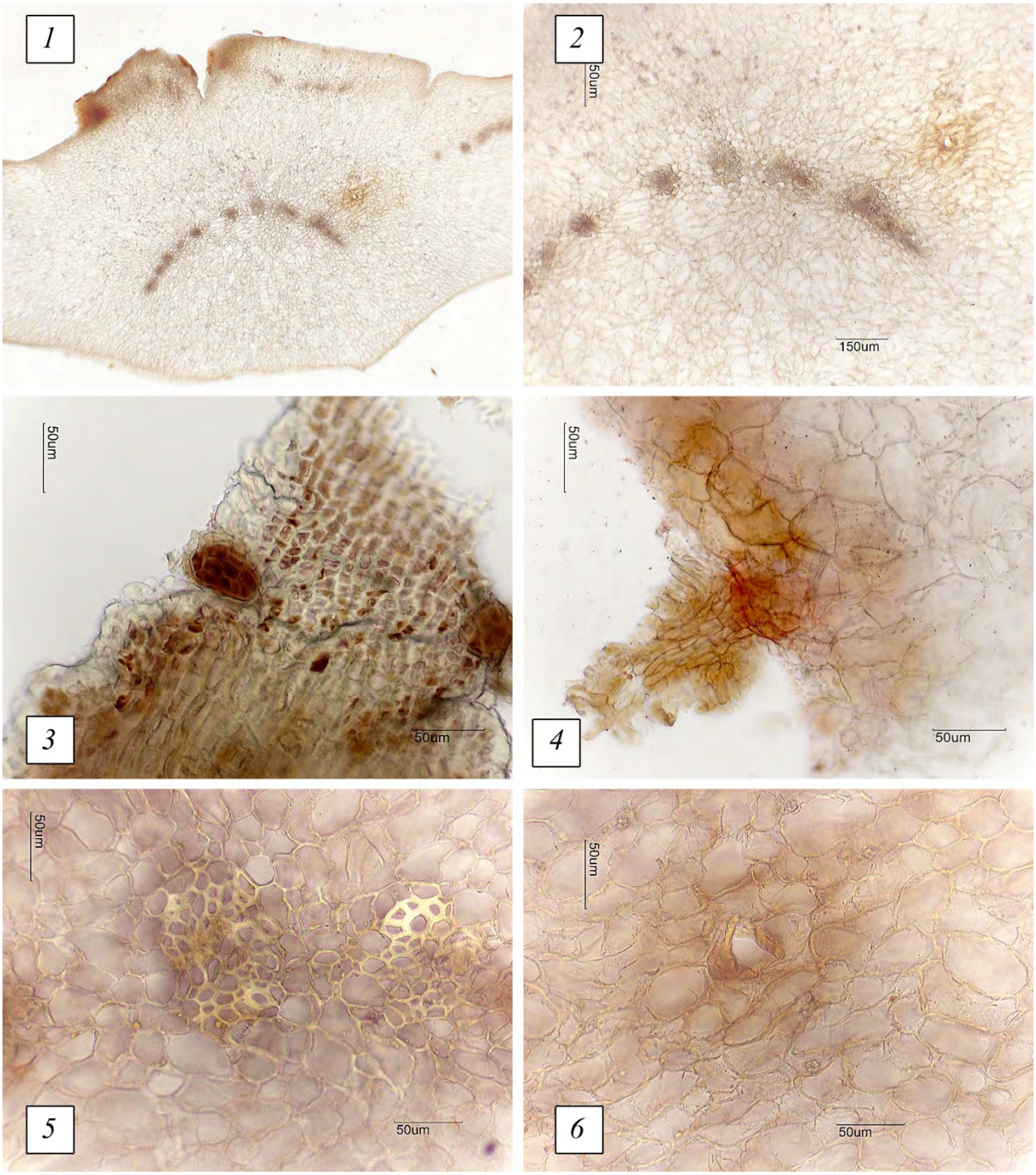


Рисунок – 2. Чешуйка соплодий.
1 – Поперечное сечение чешуйки (40×); 2 – проводящие пучки на поперечном сечении (100×); 3 – эпидермис чешуй (400×); 4 – конусовидная железка (400×); 5 – проводящий пучок (400×); 6 – вместилище в паренхиме чешуйки. Поперечный срез (400×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Качественная реакция

К 2,0 мл отвара измельченных соплодий (1:10) прибавляют 2 капли железа(III) аммония сульфата раствора 1 %; должно наблюдаться черно - синее окрашивание, быстро переходящее в черное (дубильные вещества).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 12 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3,5 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, – не более 3 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Веточек и отделившихся плодоножек. *Цельное сырье* – не более 1 %.

Соплодий с длиной общей плодоножки свыше 15 мм. *Цельное сырье* – не более 3 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 0,5 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырьё, измельченное сырье:* дубильные вещества в пересчете на танин – не менее 10 %.

Определение дубильных веществ в пересчете на танин проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1).

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Ортосифона тычиночного (почечного чая) листья
Orthosiphonis staminei folia

ФС.2.5.0088.18

Взамен ГФ XI ст. 21 (изм. № 2 от 14.11.1996)

Собранные в течение вегетации и высушенные листья и верхушки побегов культивируемого многолетнего травянистого растения ортосифона тычиночного (почечного чая) – *Orthosiphon stamineus* Benth., сем. яснотковых – *Lamiaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Куски листьев, стеблей и верхушки побегов. Листья изломанные, реже цельные, частично скрученные, коротко-черешковые. Пластинка листа ромбовидно-эллиптическая или продолговато-яйцевидная, на верхушке заостренная, у основания клиновидная, в верхней части крупнопильчатая, у основания цельнокрайняя, сверху голая, снизу по жилкам с редкими волосками. По всей пластинке листа встречаются точечные железки (под лупой). Стебли четырехгранные, толщиной до 2,5 мм, длиной до 120 мм. Верхушки побегов с супротивными листьями.

Цвет листьев зеленый, серовато-зеленый или фиолетово-коричневый; стеблей – зеленовато-коричневый, фиолетово-коричневый, на изломе желтовато-белый.

Запах характерный слабый. Вкус водного извлечения слабо-горьковатый, слегка вяжущий.

Измельченное сырье. Кусочки листьев и стеблей различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет зеленый, серовато-зеленый или фиолетово-коричневый.

Запах характерный слабый. Вкус водного извлечения слабо-горьковатый, слегка вяжущий.

Порошок. Кусочки листьев и стеблей различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

Цвет зеленый, серовато-зеленый с фиолетово-коричневыми, зеленовато-коричневыми и коричневыми вкраплениями.

Запах характерный слабый. Вкус водного извлечения слабо-горьковатый, слегка вяжущий.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье, измельченное сырье.* При рассмотрении микропрепаратов листа с поверхности должны быть видны многоугольные клетки эпидермиса с прямыми или слабоизвилистыми стенками – верхняя сторона и с сильноизвилистыми стенками, клетками меньше по размеру – нижняя сторона. Устьица присутствуют на обеих сторонах листа, более многочисленные на нижней стороне, и сопровождаются 2 – 3 окоустьичными клетками (аномоцитный тип или диацитный). Эфирномасличные железки состоят из короткой одноклеточной ножки и довольно крупной округлой или округло-четырехугольной головки (из 4, реже 6 – 8 клеток), в которой часто обнаруживается коричневое или темно-коричневое содержимое. Клетки эпидермиса вокруг места прикрепления железки образуют розетку. Встречаются простые и головчатые волоски на обеих сторонах листа. Простые волоски представлены одноклеточными и многоклеточными волосками из 2 – 7 клеток с бородавчатой поверхностью. По краю листа и по жилкам волоски более крупные. Головчатые волоски состоят из округлой одно-, двухклеточной головки, часто заполненной желто-коричневым содержимым, и короткой одноклеточной ножки.

Порошок. При рассмотрении микропрепаратов должны быть видны фрагменты эпидермиса из клеток с прямыми или слабоизвилистыми стенками. Устьица сопровождаются 2 околоустьичными клетками, расположенными перпендикулярно устьичной щели (диацитный тип). Также встречаются устьица, окруженные 3-4 клетками (аномоцитный тип). Волоски

двух типов: головчатые на короткой одноклеточной ножке с одно-, двухклеточной шаровидной головкой и простые одно- и многоклеточные с бородавчатой поверхностью. Эфирномасличные железки, по форме округлые или округло-четырехугольные, состоят из 4 реже 6 выделительных клеток.

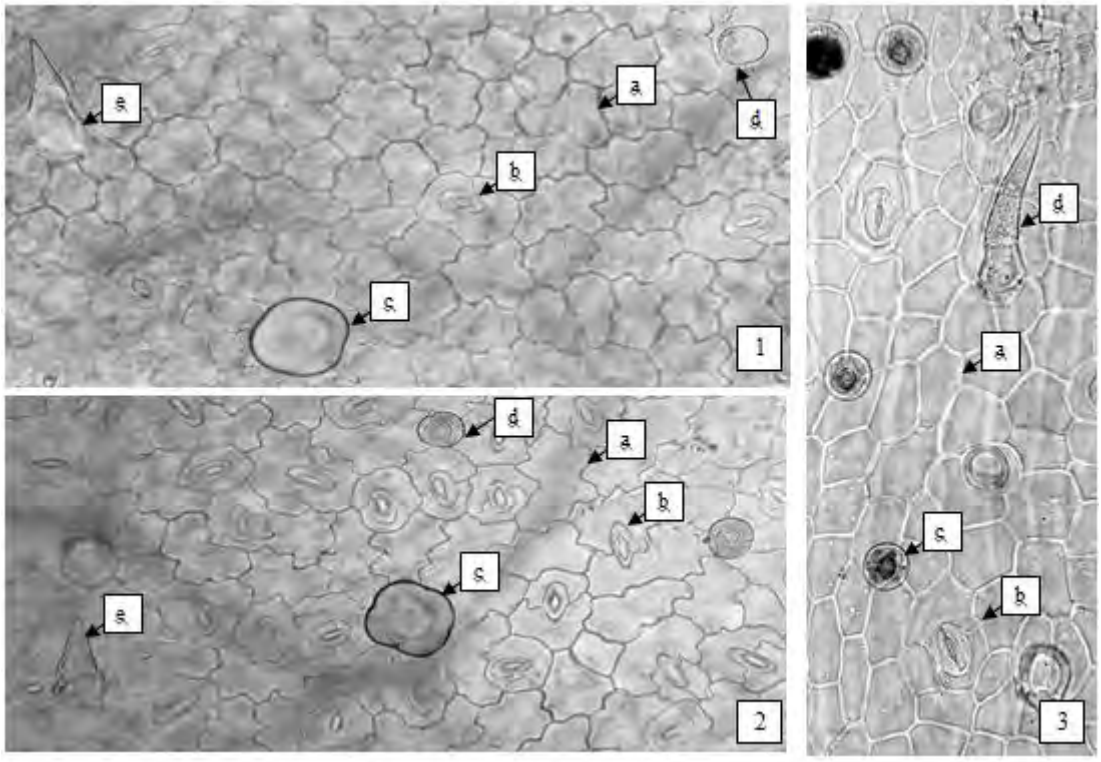


Рисунок – Ортосифона тычиночного (почечного чая) листья.
1 – фрагмент верхней стороны листа: a – клетки эпидермиса со слабоизвилистыми стенками, b – устьица диацитного типа, c – эфирномасличная железка, d – головчатый волосок, e – простой многоклеточный волосок с бородавчатой поверхностью (2-х клеточный волосок) (200×), 2 – фрагмент нижней стороны листа: a – клетки эпидермиса с сильноизвилистыми стенками, b – устьица диацитного типа, c – эфирномасличная железка, d – головчатый волосок, e – простой многоклеточный волосок с бородавчатой поверхностью (2-х клеточный волосок) (200×), 3 – фрагмент стебля: a – клетки эпидермиса с прямыми стенками, b –устьица, c – головчатый волосок, d – простой многоклеточный волосок с бородавчатой поверхностью (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление раствора стандартного образца (СО) флуоресцеина. Около 0,005 г СО флуоресцеина растворяют в 10 мл спирта 96 %. Срок год-

ности раствора не более 1 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около 1,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 5 мл спирта 96 % и нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной бане до кипения. После охлаждения до комнатной температуры полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят в виде полос длиной 10 мм и шириной не более 2 мм 5 мкл (0,005 мл) испытуемого раствора и параллельно 2 мкл 0,002 мл(раствора СО флуоресцеина. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре в течение 15 мин, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 60 мин смесью растворителей хлороформ – этилацетат – муравьиная кислота безводная (25:20:5), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, пластинку вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО флуоресцеина должна обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией желтого или зеленовато-желтого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должно обнаруживаться не менее трех зон адсорбции: темная зона ниже зоны адсорбции СО флуоресцеина; зона адсорбции с флуоресценцией ярко-голубого цвета выше зоны адсорбции СО флуоресцеина; зона адсорбции с флуоресценцией красного цвета выше зоны адсорбции СО флуоресцеина; допускается обнаружение других зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 12 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 12 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 5 %.

Измельченность сырья. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %. *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Листьев почерневших с обеих сторон. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 2 %.

Стебли, в том числе, отделенные при анализе. *Цельное сырье* – не более 30 %.

Кусочки стеблей. *Измельченное сырье* – не более 30 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 1 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок:* экстрактивных веществ, извлекаемых водой, – не менее 22 %.

Определение экстрактивных веществ проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных препаратах» (метод 1, экстрагент – вода очищенная).

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Папоротника мужского корневища **ФС.2.5.0089.18**

Dryopteris filix-mas rhizoma **Взамен ГФХ ст. 584**

Собранные осенью или ранней весной очищенные от корней и отмерших частей листьев, с оставленными основаниями листовых черешков, высушенные корневища многолетнего дикорастущего травянистого спорового растения папоротника мужского (щитовника мужского) – *Dryopterix filix-mas* (L.) Schott, сем.аспидиевых – *Aspidiaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. Цельные корневищадлиной 5-20 см, толщиной 2-3 см, а вместе с покрывающими его основаниями листовых черешков до 5-7 см, толстые корневища продольно или поперечно разрезаны. Допускаются отдельные основания черешков. На всем протяжении корневище покрыто черепицеобразно расположенными, прижатыми друг к другу основаниями листовых черешков,направленных косо вверх и по направлению к точке роста,где находятся спирально закрученные листовые почки. Основания листовых черешков покрыты светло-коричневыми пленчатыми чешуйками, особенно густо у точки роста. Цвет корневища и покрывающих его черешков снаружи черно-коричневый, на свежем изломе светло-зеленый или желто-зеленый, излом ровный. Корневище на поперечном разрезе неправильно многоугольное. За темно-коричневой линией наружного слоя следует паренхима светло-зеленого цвета. В паренхиме видны, при смачивании поперечно-

го среза раствором флороглюцина и хлористоводородной кислотой концентрированной,расположенные кольцом в числе 8-10, неодинаковые по величине проводящие пучки (столбы), окрашивающиеся в красный цвет, вокруг них рассеяны более мелкие пучки. Основания листовых черешков слегка изогнуты и сплющены с боков. На поперечном разрезе их видны проводящие пучки в числе 8-13,расположенные неполным кругом. Запах корневища слабый, вкус сначала сладко-вяжущий,затем слегка раздражающий, неприятный.

Микроскопические признаки. Строение корневища и листовых черешков на поперечных срезах, в основном, одинаково. За эпидермисом следует гиподерма, состоящая из многих рядов клеток с толстыми стенками коричневого цвета. Основная ткань состоит из рыхло расположенных клеток тонкостенной паренхимы образующих большие межклеточные пространства. В межклетниках встречаются одноклеточные шаровидные или овальные железки на тонкой ножке с желтовато-зеленым содержимым(клетки Шахта). Паренхимные клетки заполнены мелкими зернами крахмала. Проводящие пучки (столбы) отделены от основной ткани эндодермой,состоящей из одного ряда односторонне утолщенных клеток коричневого цвета. Пучки концентрические, центроксилемные. Ксилема состоит из крупных трахеид, между которыми расположены паренхимные клетки.

Чешуйки ланцетовидной формы, с сильно вытянутой заостренной верхушкой, по краям с редкими, часто двойными зубчиками, отличающимися по форме большим разнообразием.

Возможные примеси корневищ других растений.

Папоротник женский- *Athyrium filix-femina* (L.) Roth - имеет в основаниях черешков 2 пучка, железки отсутствуют. Чешуйки темно-бурые, обычно цельнокрайние.

Страусопер - *Matteuccia struthiopteris* (L.) Todaro из сем. Onocleaceae - корневище крупное, прямостоячее, овальное, в основании черешков 2 пучка, железки отсутствуют, чешуйки темно-коричневые, цельнокрайние, основания черешков трехгранные.

Папоротник игольчатый - *Dryopteris carthusiana* (Vill.) H.P. Fuchs (=*D. spinulosa* O.Kuntze) - корневища более мелкие; чешуйки по краю усажены головчатыми волосками.

Папоротник австрийский - *Dryopteris austriaca* Woynarex Schinret Thell. - корневище отличается чешуйками, несущими широкую продольную темную полосу.

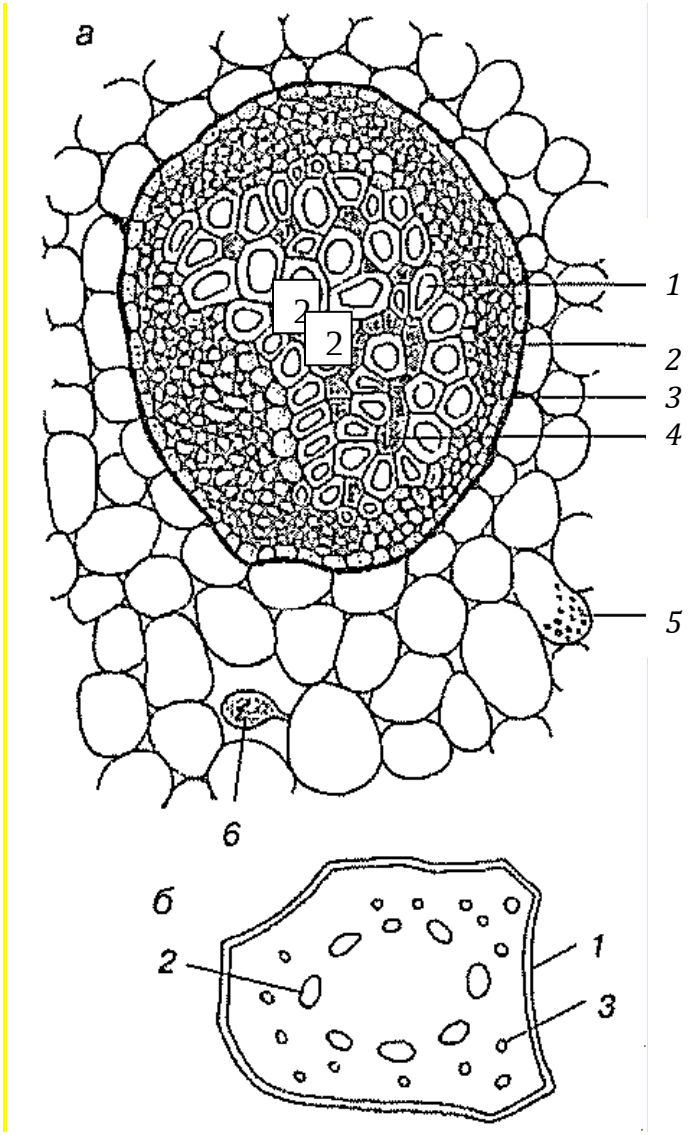


Рисунок –Папоротника мужского корневище(200×)

а – фрагмент поперечного среза корневищав области проводящего пучка: 1 – ксилема; 2- флоэма; 3 – эндодерма; 4 – клетки с бурым содержимым; 5- основная паренхима с крахмальными зернами; 6 – секреторное образование (клетка Шахта);

б – схема поперечного среза корневища (вид в лупу); 1 – эпидермис с гиподермой; 2 – крупные проводящие пучки; 3 – мелкие проводящие пучки

Определение основных групп биологически активных веществ

Качественные реакции

1. Срез черешка вымачивают в смеси спирта с эфиром (1:5), затем смачивают серной кислотой концентрированной, срез должен покрываться кристаллами.

2. При обработке поперечного среза ванилинараствором 1 % в спирте 96 %и хлористоводородной кислотой концентрированной содержимое клеток Шахта должно окрашиваться в красный цвет.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность.*Цельное сырье* - не более 14 %.

Зола общая. *Цельное сырье*– не более 3 %.

Измельченность сырья.*Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, –не более3 *%.*

Посторонние примеси

***Корневищ, побуревших в изломе и плохо очищенных от корней и остатков отмерших листьев**.Цельное сырье* – не более 5 %.

Органическая примесь.*Цельное сырье* – не более 1 %.

Минеральная примесь.*Цельное сырье*– не более 2 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественноеопределение. *Цельное сырье*: сырого филицина (суммы флороглюцидов) – не менее 1,8 %.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 50,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в аппарат Сокслета и экстрагируют около 2 часов эфиром до тех пор, пока эфир не будет стекать бесцветным и 10 *мл* эфирного извлечения не перестанут оставлять при испарении видимого остатка. Извлечение фильтруют, эфир отгоняют на водяной бане до 30 *мл,* после чего остаток взбалтывают в делительной воронке с 30 мл бария гидроксидараствора 5 %в течение 5 минут. После разделения слоев водный слой фильтруют, 24 *мл* фильтрата смешивают *с* 4 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и последовательно взбалтывают с 30, 20, 15 мл эфира. Объединенные эфирные извлечения обезвоживают 4 г натрия сульфата безводного и фильтруют через складчатый фильтр во взвешенную колбу. Сульфат натрия и фильтр промывают эфиром дважды по 10 мл. Эфир отгоняют на водяной бане, а остаток сушат в течение 1 часа при 100 °С.

Содержание сырого филицина (суммы флороглюцидов) в корневище в пересчете наабсолютно сухое сырье в процентах(*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{m \cdot 30 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot 24 \cdot (100 - W)} = \frac{m \cdot 12500}{a \cdot (100 - W)},$$

где *m*–количество сухого остатка (филицина), полученного после отгонки эфира, г;

а– навеска сырья, г;

W– влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Пастушьей сумки обыкновенной трава	**ФС.2.5.0090.18**
Capsella bursae pastoris herba	**Взамен ГФ XI ст. 46**

Собранная в фазы цветения и начала плодоношения (до побурения плодов) и высушенная надземная часть дикорастущего однолетнего растения пастушьей сумки обыкновенной – *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik., сем. капустных – *Brassicaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Облиственные стебли длиной до 40 см, простые или ветвистые, с ребристой поверхностью, голые или в нижней части слабо опушенные, с цветками, бутонами и незрелыми плодами в кистевидных соцветиях, часто с розеткой прикорневых листьев. Прикорневые листья черешковые, продолговато-ланцетные, перисторазделъные, с острыми треугольными струговидно-выемчатыми, цельнокрайними или зубчатыми долями; стеблевые – очередные, сидячие, продолговато-ланцетные цельнокрайние или выемчато-зубчатые; верхние – почти линейные со стреловидным основанием. Цветки мелкие до 4 мм в диаметре, правильные, раздельнолепестные. Чашечка из 4 продолговато-яйцевидных, зеленых чашелистиков. Венчик из 4 обратнояйцевидных лепестков. Плоды – стручочки, обратнотреугольно-сердцевидные, на верхушке слегка выемчатые, сплюснутые, с двумя раскрывающимися створками и с мелкими светло-коричневыми семенами.

Цвет стеблей, листьев и плодов зеленый, цветков и бутонов – беловатый. Запах слабый. Вкус водного извлечения горьковатый.

Измельченное сырье. Кусочки листьев, стеблей и соцветий различной формы, отдельные цветки, бутоны, плоды и их части, семена, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.

При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки листовых пластинок, на нижней и верхней сторонах которых заметны трех-, шести-, семиконечные волоски, реже– простые крупные заостренные волоски.

Цвет стеблей, листьев и плодов зеленый, цветков – беловатый, семян – светло-коричневый. Запах слабый. Вкус водного извлечения горьковатый.

Порошок. Кусочки листьев и стеблей различной формы, отдельные бутоны, части цветков и плодов, семена, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

При рассмотрении порошка под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) на нижней и верхней сторонах кусочков листовых пластинок видны трех-, шести-, семиконечные волоски, реже – простые крупные заостренные волоски. Цвет серовато-зеленый с серовато- или желтовато-белыми, светло-коричневыми вкраплениями. Запах слабый. Вкус водного извлечения горьковатый.

Микроскопические признаки *Цельное сырье.* При рассмотрении листа с поверхности должны быть видны мелкие клетки эпидермиса с тонкими стенками, с верхней стороны слабоизвилистые, с нижней – сильноизвилистые. Устьица с обеих сторон, на нижней стороне их больше, мелкие, окружены тремя клетками эпидермиса, из которых одна значительно мельче двух других (анизоцитный тип). На обеих сторонах листа – многочисленные одноклеточные разветвленные волоски: трех-, шести-, реже двух-, пяти- или семиконечные с грубобородавчатой поверхностью, лучи волоска прижаты к поверхности листа; простые волоски крупные, конические (с широким основанием и узкой заостренной верхушкой) одно-

или многоклеточные, с гладкой или слегка бородавчатой поверхностью.

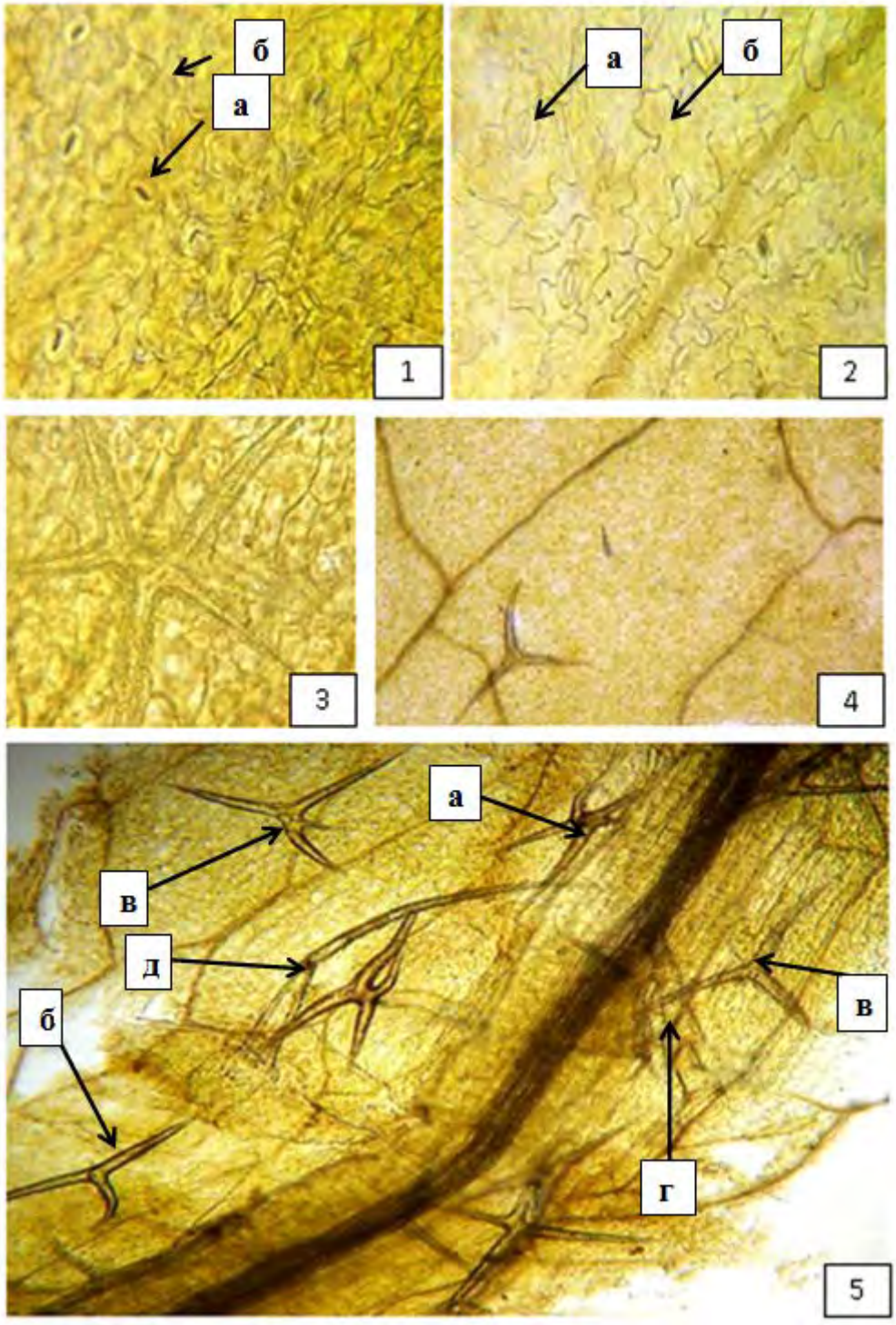


Рисунок 1 – Пастушьей сумки трава.
1 – верхний эпидермис листа: а – устьице анизоцитного типа; б – клетки со слегка извилистыми стенками (40×), 2 – нижний эпидемис листа: а – устьице анизоцитного типа; б – клетки с сильно извилистыми стенками (40×); 3– пятиконечный одноклеточный разветвленный волосок с грубобородавчатой поверхностью (40×); 4 – трехконечный одноклеточный разветвленный

волосок с грубобородавчатой поверхностью (40×); 5 – разновидности волосков на поверхности листа пастушьей сумки (200×): а – пятиконечный разветвленный волосок с грубобородавчатой поверхностью, б – одноклеточный двухконечный волосок, в – одноклеточный трехконечный волосок, г – простой одноклеточный волосок, д – простой трехклеточный волосок.

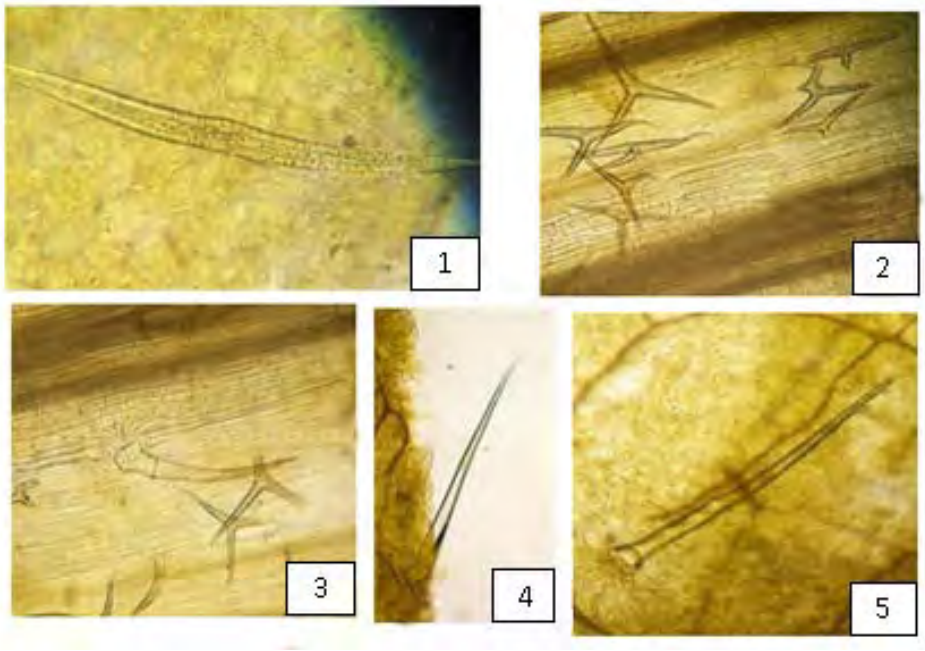


Рисунок 2 – Пастушьей сумки трава.
1 – двухконечные волоски с лучами, приподнимающимися над поверхностью листа (40×); 2 – трехконечные волоски (40×); 3 – розетка клеток при основании волоска (40×); 4 – заостренная верхушка волоска (40×); 5 – гладкая поверхность одноклеточного волоска (40×).

Эпидермис основания лепестка цветка с внешней и внутренней сторон состоит из клеток удлиненной формы с тонкими прямыми стенками. Постепенно к верхушке лепестка они сменяются клетками изодиаметрической формы с сосочковидновытянутой стенкой. Клетки эпидермиса чашелистика с двух сторон имеют удлиненно-вытянутую форму, извилистые стенки и складчатую кутикулу. Встречаются многочисленные устьица анизоцитного типа. Редко обнаруживаются простые одноклеточные волоски с слабобородавчатой поверхностью, толстыми стенками и заостренной верхушкой. В микропрепарате также обнаруживаются округлые пыльцевые зерна.

Эпидермис створки плода образован клетками удлиненно-вытянутой формы с тонкими слабо извилистыми стенками. Под эпидермисом обнаруживается слой склеренхимных волокон с толстыми пористыми стенками, расположенных перпендикулярно проводящим пучкам.

При рассмотрении «давленого препарата» стебля должны быть хорошо видны клетки эпидермиса удлиненно-прямоугольной формы с прямыми стенками, основные диагностические признаки (тип устьиц, волоски), характерные для пастушьей сумки; проводящие пучки, состоящие из спиральных, кольчатых и сетчатых сосудов.

Измельченное сырье, порошок. При исследовании микропрепаратов должны быть видны фрагменты листовой пластинки с эпидермисом, состоящим из клеток со слабо извилистыми и сильно извилистыми стенками и устьицами анизоцитного типа. На некоторых фрагментах должны быть видны простые одноклеточные волоски с широким основанием и узким заостренным концом и гладкой или слабобородавчатой поверхностью, а также волоски разветвленные одноклеточные, многоконечные (3-7 - конечные) с грубобородавчатой поверхностью. Реже встречаются фрагменты с одноклеточными двуконечными (вильчатыми) волосками. В микропрепарате могут встречаться отдельные волоски или их обломки. Кроме того, в микропрепарате обнаруживаются фрагменты цветка (лепестков, тычинок, пестика, чашелистиков, пыльцевые зерна), плода и стебля. Фрагменты цветков и стебля должны обнаруживать те же диагностические признаки (устьица анизоцитного типа, волоски), что и на фрагменты листа. Фрагменты плода должны быть представлены фрагментами эпидермиса, образованного клетками удлиненно-вытянутой формы с тонкими слабо извилистыми стенками, фрагментами склеренхимных волокон с толстыми пористыми стенками, расположенных перпендикулярно проводящим пучкам.

Определение основных групп биологически активных веществ

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) лютеолина. Около 0,005 г СО лютеолина растворяют в 25 мл спирта 96 % при нагревании (70–80 °С). Содержимое колбы охлаждают до комнатной температуры и тщательно перемешивают. Срок годности раствора 1 мес при хранении в прохладном защищенном от света месте.

Тонкослойная хроматография

Около 1,0 г сырья, измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл спирта 70 %. Колбу соединяют с обратным холодильником и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Охлажденное до комнатной температуры извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором наносят 10 мкл (0,01 мл) испытуемого раствора; рядом наносят 10 мкл (0,01 мл) раствора СО лютеолина и раствора А СО рутина (см. раздел «Количественное определение»). Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе в течение 2-3 мин, затем помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 30 мин, смесью растворителей бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:2) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО рутина должна обнаруживаться зона адсорбции коричневого цвета, на хроматограмме раствора СО лютеолина должна обнаруживаться зона адсорбции коричневого цвета выше зоны адсорбции СО рутина.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться зоны адсорбции коричневого цвета на уровне зон адсорбции СО рутина и СО лютеолина.

Затем пластинку обрабатывают парами аммиака и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограммах раствора СО рутина и раствора СО лютеолина должны обнаруживаться зоны адсорбции с флюоресценцией желто-зеленого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться зоны адсорбции с желто-зеленой флуоресценцией на уровне зон адсорбции СО рутина и СО лютеолина; допускается обнаружение других зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 13 %

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 10 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 2 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %. *Порошок*: частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %;

Посторонние примеси

Корни (в том числе отделенные при анализе), части растения, пораженные мучнистой росой, и пожелтевшие листья. *Цельное сырье* – не более 3 %;

Органическая примесь*. Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 2 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 1 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок:* суммы флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 0,5 %.

Приготовление растворов.

Раствор СО рутина. Около 0,005 г (точная навеска) СО рутина, предварительно высушенного до постоянной массы при температуре 100 – 105 °С, помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в небольшом количестве спирта 96 % при нагревании на водяной бане, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор А СО рутина). Срок годности раствора 1 мес.

1,0 мл раствора А СО рутина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 1 мл алюминия хлорида раствора 2 % и доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б СО рутина).

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 0,5 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл спирта 70 % и взвешивают с точностью ± 0,01 г, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 45 мин. После охлаждения до комнатной температуры колбу вновь взвешивают и доводят до первоначальной массы спиртом 70 %. Содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр (раствор А испытуемого раствора).

1,0 мл раствора А испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляют 1 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 %, доводят объём раствора спиртом 70 % до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора).

В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1,0 мл раствора А испытуемого раствора, доведенный спиртом 70 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл, и перемешанный.

Оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора измеряют через 40 мин на спектрофотометре при длине волны 405 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Параллельно в тех же условиях измеряют оптическую плотность раствора Б СО рутина.

В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл раствора А рутина, доведенный спиртом 70 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл, и перемешанный.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 1 \cdot 100 \cdot \text{P} \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 1 \cdot 25 \cdot 25 \cdot (100 - W) \cdot 100} = \frac{A \cdot a_0 \cdot 200 \cdot \text{P}}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)};$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
A_0 – оптическая плотность раствора Б СО рутина;
a_0 – навеска СО рутина, г;
a – навеска сырья, г;
P – содержание основного вещества в СО рутина, %;
W – влажность сырья, %.

Допускается вычислять содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в абсолютно сухом сырье с использованием удельного показателя поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;

$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при длине волны 405 нм, равный 220;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Пижмы обыкновенной цветки **ФС.2.5.0031.15**

Tanaceti vulgaris flores

Собранные в начале цветения и высушенные соцветия (цветки) дикорастущего многолетнего травянистого растения пижмы обыкновенной – *Tanacetum vulgare* L.,сем. астровых – *Asteraceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Части сложного щитковидного соцветия и отдельные цветочные корзинки. Корзинки полушаровидной формы с вдавленной серединой, диаметром 6–8 мм, состоят из мелких трубчатых цветков: краевых – пестичных, срединных – обоеполых. Цветоложе голое, неполое, слегка выпуклое, окружено обверткой из черепитчаторасположенных ланцетных с пленчатым краем листочков. Данные листочки – простые, сидячие, перисто-раздельные, от 0,5 до 1,0 см длиной, при детальном рассмотрении заметно опушенные. Цветоносы бороздчатые, голые, реже слабоопушенные. Цвет цветков желтый, листочков обвертки – коричневато-зеленый, цветоносов – светло-зеленый. Запах характерный. Вкус водного извлечения пряный, горький.

Измельченное сырье. Цельные цветочные корзинки, отдельные трубчатые цветки, цветоложа и кусочки цветоносов, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.

При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны отдельные полушаровидные цветочные корзинки с вдавленной серединой и их части с трубчатыми цветками желтого цвета с многорядной черепитчатой обверткой; слегка выпуклые отдельные цветоложа и их части.

Цвет измельченного сырья зеленовато-желтый. Запах характерный. Вкус водного извлечения пряный, горький.

Порошок. Смесь кусочков трубчатых цветков, листочков обвертки, цветоносов, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

Цвет порошка желтовато-зеленый с желтыми, зелеными, коричневато-зелеными, желтовато-серыми вкраплениями, изредка встречаются вкрапления темно-коричневого и зеленовато-фиолетового цвета. Запах характерный. Вкус водного извлечения пряный, горьковатый.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье. Измельченное сырье.* При рассмотрении листочка обвертки с поверхности должна быть видна центральная жилка, сопровождающаяся секреторными ходами; клетки эпидермиса с наружной стороны листочка крупные, с прямыми или слегка извилистыми стенками, заметна складчатость кутикулы; клетки эпидермиса с внутренней стороны узкие и сильно вытянутые. Эпидермис листочка представляет собой клетки неправильной, изодиаметричной формы с сильно утолщенными стенками, на нижнем эпидермисе имеются устьица аномоцитного типа. Эпидермис цветоложа представлен округлыми изодиаметричными клетками с темным содержимым; устьица и волоски только с наружной стороны листочка обвертки по центральной жилке и по краю: устьица окружены 4–6 околоустичными клетками, волоски многоклеточные, бичевидные. Клетки эпидермиса венчика – многоугольные, тонкостенные, некоторые из них имеют четковидные утолщения. На поверхности цветков имеются эфирномасличные железки, расположенные на завязи и у основания трубочки венчика. Железки 4-, 6-клеточные, двухрядные, двух-, трехъярусные. В мезофилле и клетках эпидермиса венчика встречаются друзы оксалата кальция. Эпидермис листочка обвертки с наружной стороны состоит из крупных клеток с прямыми или слегка извилистыми стенками и со складчатой кутикулой. Клетки эпидермиса с внутренней стороны листочка узкие и сильно вытянутые. При рассмотрении листочков обвертки с поверхности заметна центральная жилка. Устьица и волоски встречаются только в эпидермисе с наружной стороны листочка. Волоски эпидермиса многоклеточные, бичевидные. Внутренний эпидермис обвертки представлен крупными клетками с тонкой оболочкой, под ним расположена паренхима в 1 – 2 слоя крупных тонкостенных клеток.

Внутренний эпидермис покрыт выраженной кутикулой. Эпидермис внешней стороны обвертки отличается меньшими размерами клеток, более выраженной кутикулой.

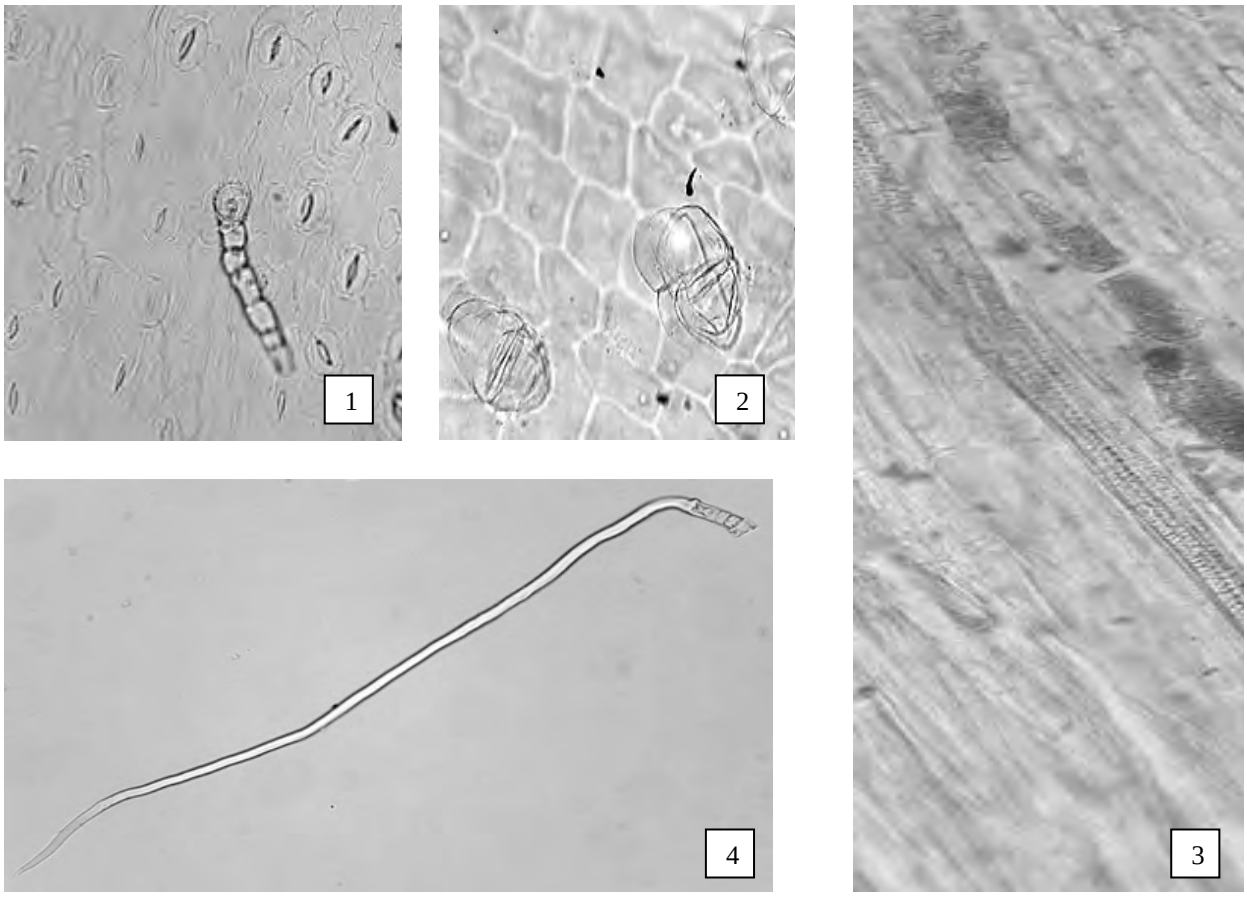
Цветоложе состоит из губчатой паренхимы с большим количеством межклетников. Клетки губчатой паренхимы округлой изодиаметрической формы, практически бесцветны, изредка содержат хромопласты желтого цвета. Наружный слой паренхимы цветоложа содержит большое количество мелких сосудистых пучков.

Пыльники тычинок крупные вытянутые, с заостренными верхушками. Теки пыльников двухгнездные, заполненные пыльцой желтого цвета. Тычиночные нити длинные, бесцветные с заметным проводящим пучком, из 2 спиральных сосудов. Эпидермис тычиночных нитей представлен слабовытянутыми, тонкостенными клетками. Пестик имеет 2 рыльца, поверхность которых неровная, ворсинчатая. Столбик пестика крупный, бесцветный. Паренхима завязи содержит друзы оксалата кальция. На поверхности цветков имеются эфирномасличные железки. Железки 4-, 6-клеточные, двухрядные, двух-, трехъярусные. В столбике два проводящих пучка.

Цветонос представляет собой полый стебель пучкового строения. Пучки в кольце закрытые коллатеральные с сильно выраженным слоем склеренхимы. Проводящие элементы представлены спиральными и кольчатыми сосудами.

Порошок. При исследовании порошка должны быть видны фрагменты листочков обвертки с крупными клетками эпидермиса с прямыми или слегка извилистыми стенками, складчатой кутикулой, устьицами аномоцитного типа, многоклеточными, бичевидными волосками (наружная сторона), сосредоточенные главным образом по центральной жилке и по краю, и с узкими, сильно вытянутыми клетками эпидермиса (внешняя сторона); фрагменты эпидермиса нижней части трубки венчика трубчатого цветка, состоящего из тонкостенных изодиаметричных клеток; фрагменты

эпидермиса средней части трубки венчика прозенхимной формы; фрагменты эпидермиса трубки венчика с многочисленными железистыми трихомами; фрагменты эпидермиса тычиночных нитей со слабо вытянутыми, тонкостенными клетками; фрагменты эпидермиса с эфирномасличными железками 4-, 6-клеточными, двухрядными, двух-, трехъярусными; фрагменты центральной жилки с секреторными ходами; отдельные эфирномасличные железки; мелкие друзы оксалата кальция.



Рисунок– Пижмы обыкновенной цветки.

1 – фрагмент эпидермиса листочка обвертки: а – устьица аномоцитного типа, (200×); 2 – эфирномасличные железки (400×); 3 – секреторный ход с маслянистым содержимым вдоль центральной жилки (200×); 4 – фрагмент бичевидного волоска (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором наносят 20 мкл

испытуемого раствора (см. раздел «Количественное определение» приготовление раствора А испытуемого раствора) и10 мкл раствора стандартного образца (СО)лютеолина (см. раздел «Количественное определение»приготовление раствора А СО лютеолина). Пластинку с нанесенными пробами сушат, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 1 ч смесью растворителей хлороформ–спирт 96%–вода (26:16:3), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80–90% длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей.

Пластинку обрабатывают диазореактивом, выдерживают при 100–105 °С и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО лютеолина должна обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией желтого или желто-оранжевого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции желтого цвета ниже зоны лютеолина; допускается обнаружение других зон адсорбции (флавоноиды).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* –не более 13 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* –не более 9 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* –не более 4 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, не более 5 %. *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Цветочные корзинки и их части. *Цельное сырье, измельченное сырье* –не менее 60 %, в том числе корзинки, изменившие окраску (потемневшие и почерневшие), – не более 8 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* –не более 1 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* –не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок:* суммы флавоноидов и фенолкарбоновых кислот в пересчете на лютеолин– не менее 2,5 %.

Приготовление растворов.

Приготовление буферного раствора pH 9,0: к 900 мл раствора натрия тетрабората (0,05 моль/л) прибавляют 100 мл раствора хлористоводородной кислоты (0,1 моль/л) и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Приготовление раствора СО лютеолина: около0,050 г (точная навеска)СО лютеолина, предварительно высушенного при температуре 105-110 °С в течение 2 ч, растворяют в 85 мл буферного раствора pH 9,0 в мерной колбе вместимостью100 мл, доводят объем раствора тем же буферным раствором до метки и перемешивают (раствор А СО лютеолина). Срок годности раствора 7 сут.

1,0 мл раствора А СО лютеолина, помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора до метки буферным раствором pH 9,0 и перемешивают (раствор Б СО лютеолина), готовят перед использованием.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 2,0 г(точная навеска) измельченного сырья помещают в плоскодонную колбу с притертой пробкой вместимостью 300 мл и прибавляют 200 мл спирта 96 %. Колбу закрывают и взвешивают с погрешностью ± 0,01 г, затем присоединяют к обратному холодильнику с водяным охлаждением и нагревают на водяной бане в течение 3,5 ч. Колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и доводят массу колбы до первоначального спиртом 96%. Извлечение отфильтровывают через бумажный фильтр, отбрасывая первые 20 мл фильтрата. 50,0 мл фильтрата переносят в круглодонную колбу вместимостью250 мл и отгоняют спирт под вакуумом досуха. Сухой остаток в колбе промывают 3 раза по 20 мл дихлорэтаном, насыщенным водой. Затем содержимое колбы количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл с помощью буферного раствора рН 9,04 раза порциями по 20 мл. Объем раствора в мерной колбе доводят до метки тем же буферным раствором и перемешивают. Содержимое колбы переносят в делительную воронку вместимостью 250 мл и очищают дихлорэтаном 4 раза порциями по 20 мл. В мерную колбу вместимостью 25 мл переносят 1,0 мл очищенного раствора, доводят объем раствора буферным раствором рН 9,0 до метки и перемешивают (раствор А испытуемого раствора).

Оптическую плотность раствора А испытуемого раствора измеряют на спектрофотометре при длине волны 310 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют буферный раствор рН 9,0.Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО лютеолина.

Содержание суммы флавоноидов и фенолкарбоновых кислот в пересчете на лютеолин и абсолютно сухое сырье в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 200 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 1 \cdot P \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 50 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 50 \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot a_0 \cdot 200 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где: *A*– оптическая плотность раствора А испытуемого раствора;

A_0– оптическая плотность раствора Б СО лютеолина;

a– масса сырья, г;
a_0– масса СО лютеолина, г;
W–влажность сырья, %.
P– содержание основного вещества в СО лютеолина, %.

Допускается содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-глюкозида вычислять с использованием удельного показателя поглощения комплекса лютеолин-7-глюкозида с алюминия хлоридом по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 125000}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где A– оптическая плотность испытуемого раствора А;
$A_{1см}^{1\%}$– удельный показатель поглощения комплекса лютеолин-7-глюкозида с алюминия хлоридом при длине волны 400 нм, равный 145;
a – навеска препарата, г;
W– влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Подорожника большого листья **ФС.2.5.0032.15**

Plantaginis majoris folia

Собранные в период цветения и высушенные листья дикорастущего и культивируемого многолетнего травянистого растения подорожника большого – *Plantago major* L., сем.подорожниковых – *Plantaginaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Цельные или частично измельченные листья, простые, форма листа широкояйцевидная или широкоэллиптическая, у основания округлая, верхушка заостренная или притуплённая, черешок крылатый, голый, различной длины. В месте обрыва черешка видны длинные остатки нитевидных жилок. Край листа цельный или слегка зубчатый, жилкование дугонеровное; поверхность листа голая с обеих сторон, длина листьев с черешком до 24 см, ширина от 3 до 11 см. Цвет листовых пластинок от светло-зеленого до коричневато-зеленого, черешков – светло-зеленого, беловато-серого или желтовато-белого, часто с фиолетовым оттенком. Запах слабый.Вкус водного извлечения слабо-горьковатый.

Измельченное сырье. Кусочки листовых пластинок и черешков различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.

При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) виднымкусочки листовых пластинок от светло-зеленого до коричневато-зеленого цвета с неровной поверхностью и, редко, белесыми торчащими волосками, кусочки черешков светло-зеленого,

желтовато-белого или белого цвета, часто с фиолетовым оттенком, на поперечном сечении которых могут быть видны черные дугообразные пятна (сосудисто-волокнистые пучки).

Цвет измельченного сырья от светло-зеленого до коричневато-зеленого с коричневыми, белыми, желтовато-белыми и редкими фиолетовыми вкраплениями. Запах слабый.Вкус водного извлечения слабо-горьковатый.

Порошок. Кусочки листовых пластинок и черешков различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

При рассмотрении порошка под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки листовых пластинок от светло-зеленого до коричневато-зеленого цвета с неровной поверхностью и, редко, белесыми торчащими волосками, кусочки черешков светло-зеленого, желтовато-белого или белого цвета, часто с фиолетовым оттенком, на поперечном сечении которых могут быть видны черные дугообразные пятна (сосудисто-волокнистые пучки).

Цвет порошка от светло-зеленого до коричневато-зеленого с коричневыми, белыми, желтовато-белыми и редкими фиолетовыми вкраплениями. Запах слабый.Вкус водного извлечения слегка горьковатый.

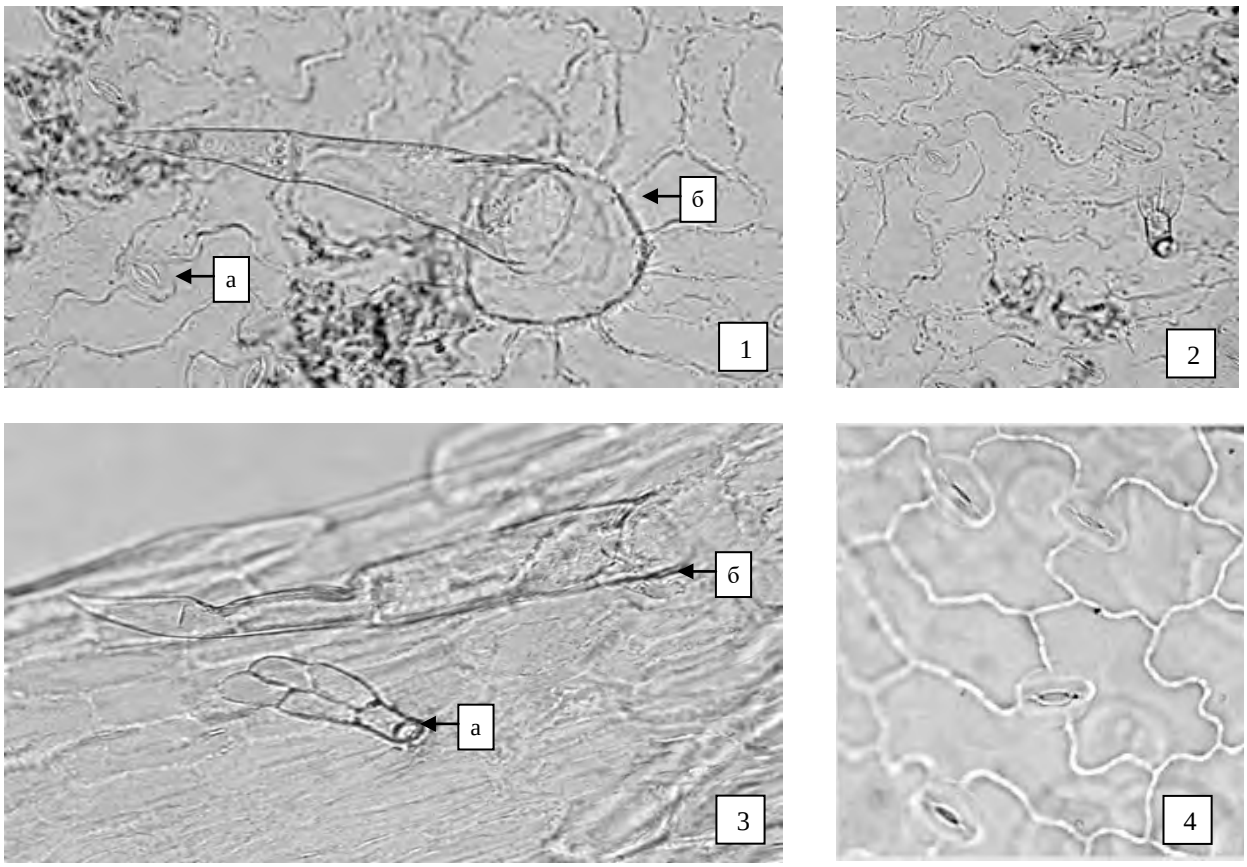
Микроскопические признаки. *Цельное и измельченное сырьё.*При рассмотрении листа с поверхности на верхней стороне листовой пластинки видны многоугольные клетки эпидермиса с прямыми боковыми стенками. Клетки нижнего эпидермиса со слабоизвилистыми стенками. Кутикула местами образует складки.Устьица на обеих сторонах листа аномоцитного типа, округлые, окружены 3–4 клетками эпидермиса. Встречаются простые и головчатые волоски. Простые волоски конической формы с расширенным основанием, многоклеточные, гладкие, встречаются редко, часто оборваны. Головчатые волоски 2 типов – на одноклеточной ножке с удлиненной двухклеточной головкой – встречаются по всей поверхности с обеих сторон листа, реже встречаются головчатые волоски на многоклеточной ножке с шарообразной или овальной одноклеточной головкой. В местах прикрепления волосков клетки эпидермиса образуют розетку из 6-9 клеток.

Порошок. При рассмотрении микропрепаратов видны фрагменты эпидермиса верхней стороны листа из клеток с почти прямыми стенками, нижней – со слабоизвилистыми стенками; клетки эпидермиса над крупными жилками и черешка листа – продольно-вытянутые; кутикула местами складчатая; округлые устьица окружены 3–4 околоустьичными клетками (аномоцитный тип) – более многочисленные на нижней стороне листа; волоски –простые многоклеточные с расширенным основанием, иногда со спавшимися клетками;головчатые волоски, как правило, на одноклеточной ножке с удлиненной двухклеточной головкой и, реже, на многоклеточной ножке с шарообразной или овальной одноклеточной головкой, встречаются также головчатые волоски с 3- или 4-клеточной головкой, клетки последней часто с заостренными концами, располагаются в 2 ряда (волоски могут быть обломаны и видны только округлые места их прикрепления); в местах прикрепления волосков клетки эпидермиса образуют розетку; фрагменты черешка, в которых проводящие пучки представлены спиральными и сетчатыми сосудами в сопровождении многочисленных неодревесневших волокон.

Примечание.К другим видам подорожников, встречающимся в сырье как примесь, относят:

а) Подорожник средний (*Plantagomedia*L.): листовая пластинка эллиптическая, опушенная, особенно по жилкам и краю листа. Под микроскопом при рассмотрении эпидермиса видны многочисленные простые, многоклеточные волоски, не имеющие расширенного основания, с гладкой или нежно-бородавчатой поверхностью, тонкостенные, часто со спавшимися члениками. Головчатые волоски с одноклеточной ножкой и удлиненной двухклеточной головкой.

б) Подорожник ланцетный (*Plantagolanceolata*L.): листовая пластинка удлиненно-ланцетовидная, опушена по жилкам. Под микроскопом при рассмотрении эпидермиса по жилкам и краю листа встречаются заостренные, длинные, толстостенные волоски, имеющие одну короткую базальную клетку и 2–3 длинные конечные клетки со своеобразным их сочленением. Головчатые волоски имеют одноклеточную ножку и многоклеточную (из 8–10 клеток) головку.



Рисунок–Подорожника большого листья.

1 – фрагмент эпидермиса нижней стороны листа: а– устьицааномоцитного типа, б – простой волосок (200×), 2 – фрагмент нижней стороны листа с головчатым волоском (200×), 3 – фрагмент эпидермиса с головчатым волоском (а) и крупным многоклеточным волоском со спавшейся клеткой (б) (200×), 4 – устьицааномоцитного типа (400×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Качественные реакции

1. К 10 мл раствора А (см. раздел «Количественное определение. Полисахариды») прибавляют 30 мл спирта 96 % и перемешивают; появляются хлопьевидные сгустки, выпадающие в осадок при стоянии(полисахариды).

2. Раствор с осадком фильтруют через стеклянный фильтр ПОР-16, осадок с фильтра переносят в колбу вместимостью 50 мл с помощью натрия гидроксида раствора0,1 М. К 1 мл полученного раствора прибавляют 0,25 мл карбазола раствора 0,5 % и 5 мл серной кислоты концентрированной,

перемешивают и нагревают на водяной бане в течение 10 мин; появляется красно-фиолетовое окрашивание (галактуроновая кислота).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* –не более14 %.

Зола общая. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* –не более 20 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* –не более 6 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, не более 5 %.*Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Листья, изменившие окраску (потемневшие и почерневшие).*Цельное сырье* –не более 5 %.

Кусочки листьев, изменивших окраску(потемневшие и почерневшие). *Измельченное сырье* –не более 5 %.

Цветочные стрелки.*Цельное сырье* –не более 1 %.

Кусочки цветочных стрелок.*Измельченное сырье* –не более 1 %.

Органическая примесь.*Цельное сырье,измельченное сырье* –не более 1 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* –не более 1 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение.*Цельное сырьё, измельченное сырье, порошок:* полисахаридов – не менее 12 %; экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 70 %, – не менее 20 %.

Полисахариды.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Около 10,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 500 мл, прибавляют 200 мл воды очищенной, нагретой до кипения. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и кипятят при перемешивании на электрической плитке в течение 30 мин. Экстракцию повторяют ещё 2 раза, используя по 200 и 100 мл воды соответственно.

Водные извлечения объединяют и фильтруют в мерную колбу вместимостью 500 мл через 5 слоёв марли, вложенной в стеклянную воронку и предварительно промытой водой очищенной. Фильтр промывают водой и доводят объём раствора тем же растворителем до метки (раствор А).

25,0 мл раствора А помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 75 мл спирта 96 %, перемешивают, подогревают на водяной бане в течение 30 мин. Содержимое колбы фильтруют через предварительно высушенный и взвешенный беззольный бумажный фильтр. Осадок на фильтре последовательно промывают 15 мл раствора спирта 96 % в воде очищенной (3:1), 10 мл смеси этилацетата и спирта 96 % (1:1). Фильтр с

осадком сушат сначала на воздухе, затем при температуре 100 – 105 °Сдо постоянной массы.

Содержание полисахаридов впересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 500 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot 25 \cdot (100 - W)} = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 2000000}{a \cdot (100 - W)},$$

гдеm_1 – вес фильтра, г;

m_2 – вес фильтра с осадком, г;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Экстрактивные вещества.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье» (метод 1, из навески сырья 1,0 г, сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, экстрагент – спирт 70 %).

Примечание. Определение полисахаридов проводят для сырья, предназначенного для производства лекарственных растительных препаратов (пачки, фильтр-пакеты); определение экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 70 %, проводят для сырья, предназначенного для производства настойки, экстракта.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Полыни горькой трава **ФС.2.5.0033.15**

Artemisiae absinthii herba

Собранная в начале цветения и высушенная трава дикорастущего многолетнего травянистого растения полыни горькой – *Artemisia absinthium* L.*,* сем.астровых –*Asteraceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки.*Цельное сырье*. Цельные или частично измельченные верхушки цветоносных стеблей длиной не более 25 см. Стебли цилиндрические, слегка ребристые, иногда ветвистые, заканчивающиеся облиственной раскидистой сложной метелкой, веточки которой несут мелкие корзинки диаметром 2,5–4 мм. Верхние прицветные листья сидячие, ланцетные или продолговатые, ниже на цветоносе листья тройчато-раздельные, край листа цельный, жилкование перистое, листья густо опушены короткими волосками с обеих сторон.

Цветки собраны в шаровидные поникающие корзинки, образующие метелку. Обертка черепитчатая, двухрядная, наружные листочки линейные, снаружи шерстистые, внутренние –широкоэллиптические, тупые, пленчатые. Цветки мелкие, наружные трубчатые – пестичные, внутренние воронковидные – обоеполые. Цветоложе выпуклое, усажено узкими, белыми пленчатыми прицветниками. Цвет стеблей – зеленовато-серый, листьев сверху – серовато-зеленый, снизу – серебристо-серый, цветков – желтый.Запах сильный, характерный.Вкус водного извлечения пряно-горький.

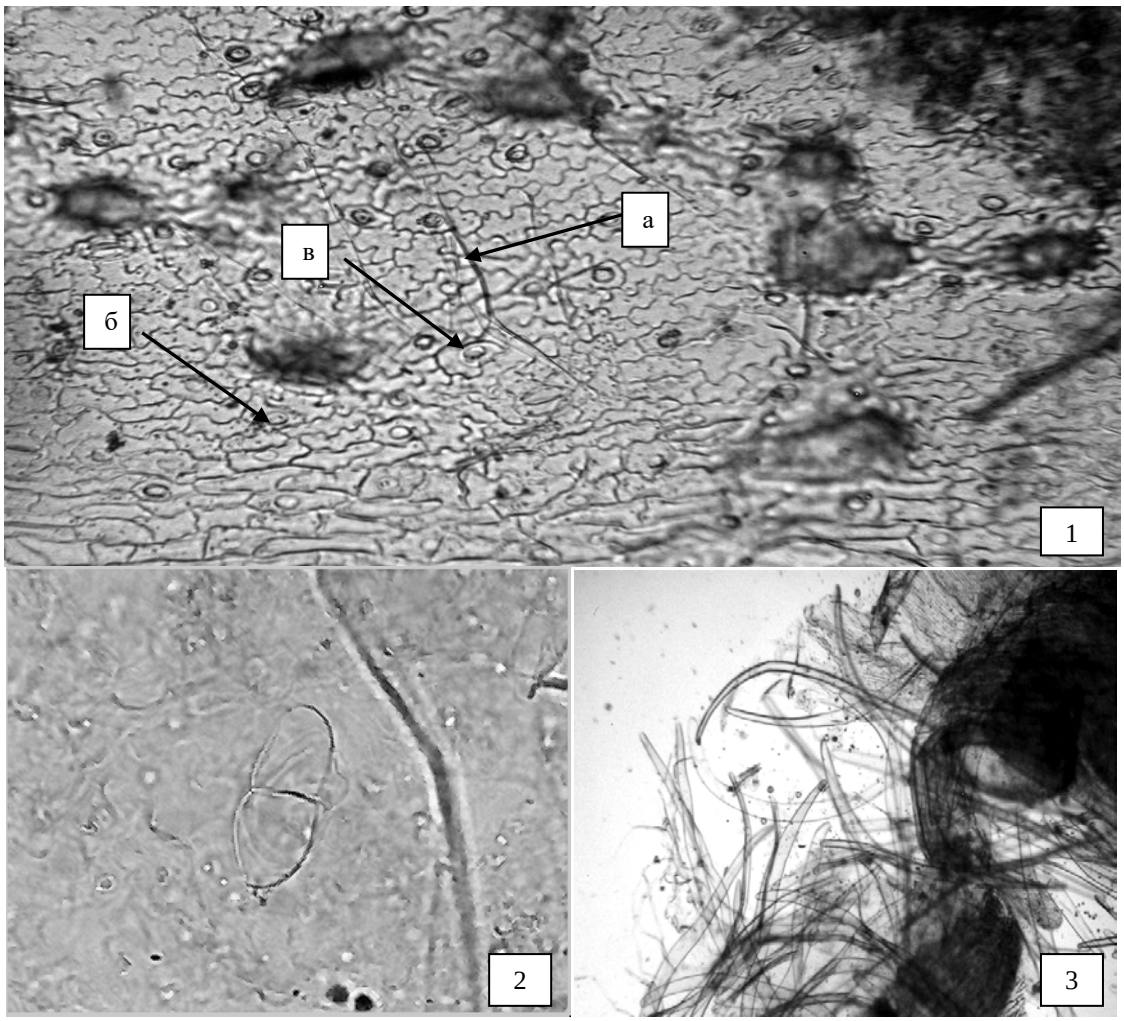
*Измельченное сырье.*Кусочки стеблей, листьев, соцветий, проходящие

сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет стеблей зеленовато-серый, листьев - серебристо-серый, соцветий – желтый. Запах сильный, характерный. Вкус водного извлечения пряно-горький.

Микроскопические признаки.*Цельное сырье, измельченное сырье.*При рассмотрении микропрепаратов с поверхности верхней стороны листовой пластинки видны извилистые клетки эпидермиса. Клетки нижнего эпидермиса – с более извилистыми стенками. Устьица расположены на верхней и нижней сторонах листа.

Устьица овальные, мелкие, аномоцитногоустьичного типа, окруженные 3–5 клетками. Волоски простые, многоклеточные, Т-образные, состоящие из короткой 2–4-клеточной ножки, несущей длинную тонкостенную клетку с заостренными концами, прикрепленную к ножке посередине и лежащую горизонтально. Места прикрепления волосков имеют вид круглых валиков. На обеих сторонах листа расположены крупные, овальные эфирномасличные железки с поперечной перегородкой, сидящие в углублениях. По краям и в разрезе железок видно, что они состоят из 8 (реже 6) выделительных клеток, расположенных в 2 ряда и 4 яруса, на короткой одноклеточной ножке. Палисадная ткань однорядная, расположена по обеим сторонам листа, губчатая – из округлых тонкостенных клеток с большими межклетными пространствами.

Эпидермис цветков имеет прямоугольные клетки с мелкоизвилистыми стенками, пыльца округлая, мелкоячеистая. Цветоложе густо опушено простыми мечевидными волосками. Волоски в основании имеют 2 – 4 мелкие продолговатые клетки с тонкими стенками, конечная клетка длинная, у основания узкая, затем расширяющаяся, с толстыми стенками, слегка извилистая, часто отламывается. Основание волосков железистое. Эфирномасличные вместилища многочисленные, схизогенные, округлые или овальные. Эпидермис стебля состоит из прямостенных клеток.



Рисунок–Полыни горькой трава.

1 –верхняя сторона листа: а –Т-образные волоски с двухклеточными основаниями, б– извилистые стенки эпидермиса, в – округлые места прикрепления волосков(200×); 2 –эфиромасличная железка (вид сверху)(400×); 3 –опушение простыми мечевидными волосками(400×)

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) рутина. Около 0,001 г рутина (рутина тригидрата) растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности растворане более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

*Раствор СО хлорогеновой кислоты.*Около 0,001 г хлорогеновой кислоты растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности растворане более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около 1,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1,0 мм, помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл спирта 96 %, нагревают с обратным холодильником на водяной бане в течение 10 мин. После охлаждения до комнатной температуры извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 30 мкл испытуемого раствора и параллельно в одну полосу по 10 мкл растворов СО рутина и хлорогеновой кислоты. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре в течение 5 мин, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 30 мин смесью растворителей этилацетат - муравьиная кислота безводная - вода (40:4:6) и хроматографируют восходящим способом.

Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей в вытяжном шкафу. Далее пластинку нагревают в сушильном шкафув течение 2–3 мин при температуре 100–105 ºС и еще теплую обрабатывают последовательно дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира раствором 1 % в спирте96 %и макрогола 400 раствором спиртовым 5 %.

Через 30 мин после обработки пластинку рассматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме растворов СО рутина и СО хлорогеновой кислоты должны обнаруживаться: зона адсорбции желтого, желто-оранжевого или оранжевого цвета (рутин), и над ней зона адсорбцииголубого цвета (хлорогеновая кислота).

На хроматограммеиспытуемого раствора должны обнаруживаться: зона адсорбциижелтого, желто-зеленого, желто-оранжевого или оранжевого цвета на уровне зоны рутина; две зоны адсорбцииголубого цвета – на уровне зоны адсорбцииСО хлорогеновой кислоты и выше нее; допускается обнаружение

других зонадсорбции (флавоноиды).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье,измельченное сырье*–не более 13 %.

Зола общая. *Цельное сырье,измельченное сырье*–не более 13 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье,измельченное сырье*–не более 3 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, – не более 3 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Части, изменившие окраску (потемневшие и почерневшие).*Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3 %.

Стебли диаметром свыше 3 мм.*Цельное сырье,измельченное сырье* –не более 3 %.

Органическая примесь.*Цельное сырье,измельченное сырье* –не более 2 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье,измельченное сырье*–не более 1,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное*

*сырье:*сумма флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 0,3 %; эфирного масла – не менее 0,2 %, экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 70 %, – не менее 20 %.

Сумма флавоноидов

Приготовление растворов.

*Раствор СО рутина.*Около 0,05 г(точная навеска) рутина, предварительно высушенного при 130 – 135 °С в течение 3 ч, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и растворяют при нагревании на водяной бане в 85 мл спирта 96 %, охлаждают, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор А СО рутина). Срок годности растворане более 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

2,0 мл растворАСО рутина, 4 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 % и 1 каплю уксусной кислоты разведенной 30 %, помещенных в мерную колбу вместимостью 25 мл доведенных спиртом 96 % до метки (раствор Б СО рутина). Срок годности растворане более 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величинычастиц, проходящих через сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 60 мл спирта 70 %. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане в течение 30 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Горячее извлечение фильтруют через бумажный складчатый фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. После охлаждения фильтр промывают 40 мл спирта 70 %, объем извлечения доводят до метки и перемешивают (раствор А испытуемого раствора).

5,0 мл раствора А испытуемого раствора, помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл,прибавляют 4 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 %, 1 каплю уксусной кислоты разведенной 30 %, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б испытуемогораствора).

Оптическую плотность раствора Биспытуемого раствораизмеряют

через 30 мин на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из5,0 мл раствора А испытуемого раствора и1 капли уксусной кислоты разведенной 30 %доведенный спиртом 96 %до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность растворaБ СО рутина в таких же условиях. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из2,0 мл раствора А СО рутина, 1 капли уксусной кислоты разведенной 30 %, доведенный спиртом 96 %до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете нарутини абсолютно сухое сырье в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 2 \cdot 100 \cdot 25 \cdot P \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot 100 \cdot 25 \cdot a \cdot 5 \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot a_0 \cdot P \cdot 40}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
$A_о$ – оптическая плотность раствора Б СО рутина;
a – навеска сырья, г;
$a_о$ – навеска СО рутина, г;
P – содержание основного вещества в СО рутина, %;
W – влажность сырья, %.

Допускается содержание суммы флавоноидов в пересчете нарутинвычислять с использованием удельного показателя поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1см}^{1\%} \cdot a \cdot 5 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 50000}{A_{1см}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
$A_{1см}^{1\%}$–удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при длине волны 410 нм, равный 260;
a – навеска сырья, г;
W – влажность сырья, %.

Экстрактивные вещества.В соответствии с требованиями ОФС

«Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1, экстрагент – спирт 70 %).

Эфирные масла.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 2, из навески 20,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, время перегонки –3 ч).

Примечание.Определение суммы флавоноидов в пересчете на рутин проводят в сырье, предназначенном для получения лекарственных растительных препаратов (пачки); эфирного масла и экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 70 %, – в сырье, предназначенном для получения настоек.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Пустырника трава **ФС.2.5.0034.15**

Leonuri herba

Собранная в фазу начала цветения и высушенная трава дикорастущего и культивируемого травянистого растения пустырника пятилопастного– *Leonurus quinquelobatus* Gilib. и пустырника сердечного (пустырника обыкновенного) – *Leonurus cardiaca* L. (*L. cardiaca*, *L. subsp.villosus* (Desf.) Jav.), сем.яснотковых– *Lamiaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки.*Цельное сырье.* Верхние части стеблей, длиной до 40 см с цветками и листьями, могут встречаться отдельные листья, цветки, части соцветий и стеблей. Стебель четырехгранный, опушенный, или опушение только по ребрам, полый, толщиной до 0,5 см. Листья супротивные, нижние – трех-, пятилопастные или раздельные, в соцветиях – трехлопастные или ланцетовидные, зубчатые или цельнокрайние с клиновидным основанием, длиной до 14 см, шириной до 10 см. Соцветия колосовидные, прерванные; цветки и бутоны собраны в мутовки по 10–20 в пазухах листьев. Чашечка трубчато-колокольчатая с 5 шиловидно-заостренными зубцами, коническая, колючая. Венчик длиной до 0,12 см, двугубый, длиннее чашечки, верхняя губа цельнокрайняя, нижняя– трехлопастная; тычинок 4; завязь нижняя. Стебли, листья, чашечки цветков опушены волосками.

Цвет стеблей серовато-зеленый, коричневато-зеленый, листьев – темно-зеленый, серовато-зеленый, чашелистиков – зеленый, венчиков – серовато-

розовый или розовато-фиолетовый. Запах слабый.Вкус водного извлечения горьковатый.

Измельченное сырье. Кусочки стеблей, листьев, соцветий, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.

При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) виднькусочки стебля, четырехгранного или (чаще) расщепленного с опушенной (для пустырника сердечного слабоопушенной) серовато-зеленой, коричневато-зеленой поверхностью; кусочки листьев– темно-зеленые, серовато-зеленые, сильно опушенные; цветки или их части: чашечка трубчато-колокольчатая, опушенная, с колючими зубцами, венчик двугубый серовато-розовый или розовато-фиолетовый, опушенный снаружи.

Цвет измельченного сырья серовато-зеленый. Запах слабый. Вкус водного извлечения горьковатый.

Порошок. Кусочки стеблей, цветоносов, листьев и соцветий,проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

При рассмотрении порошка под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки серовато-зеленого стебля, опушенного волосками с поверхности и беловатого или желтовато-белого на изломе; зеленые частицы опушенных листьев и чашечки, фрагменты опушенного серовато-розового или розово-фиолетового венчика.

Цвет порошка от серовато-зеленого до коричневато-зеленого с многочисленными беловатыми, желтовато-белыми, серовато-белыми, розово-фиолетовыми и серовато-розовыми вкраплениями. Запах слабый. Вкус водного извлечения горьковатый.

Микроскопические признаки.*Цельное сырье, измельченное сырье.* При рассмотрении препаратов листа с поверхности с обеих сторон должны быть видны клетки эпидермиса с тонкими извилистыми боковыми стенками. Многочисленные устьица присутствуют на нижней стороне и сопровождаются 3–4 (редко 2) околоустьичными клетками (аномоцитныйтип). На обеих сторонах листа встречаются многочисленные

простые многоклеточные волоски с бородавчатой поверхностью, состоящие из 2–5 клеток, расширенные в местах сочленения, и редкие простые одноклеточные волоски, а также головчатые волоски на одно-, двухклеточной короткой ножке с округлой головкой, состоящей из 1-2 клеток. Преимущественно на нижней стороне листа расположены эфирномасличные железки, состоящие из 4–6 (реже 8) выделительных клеток на короткой ножке.

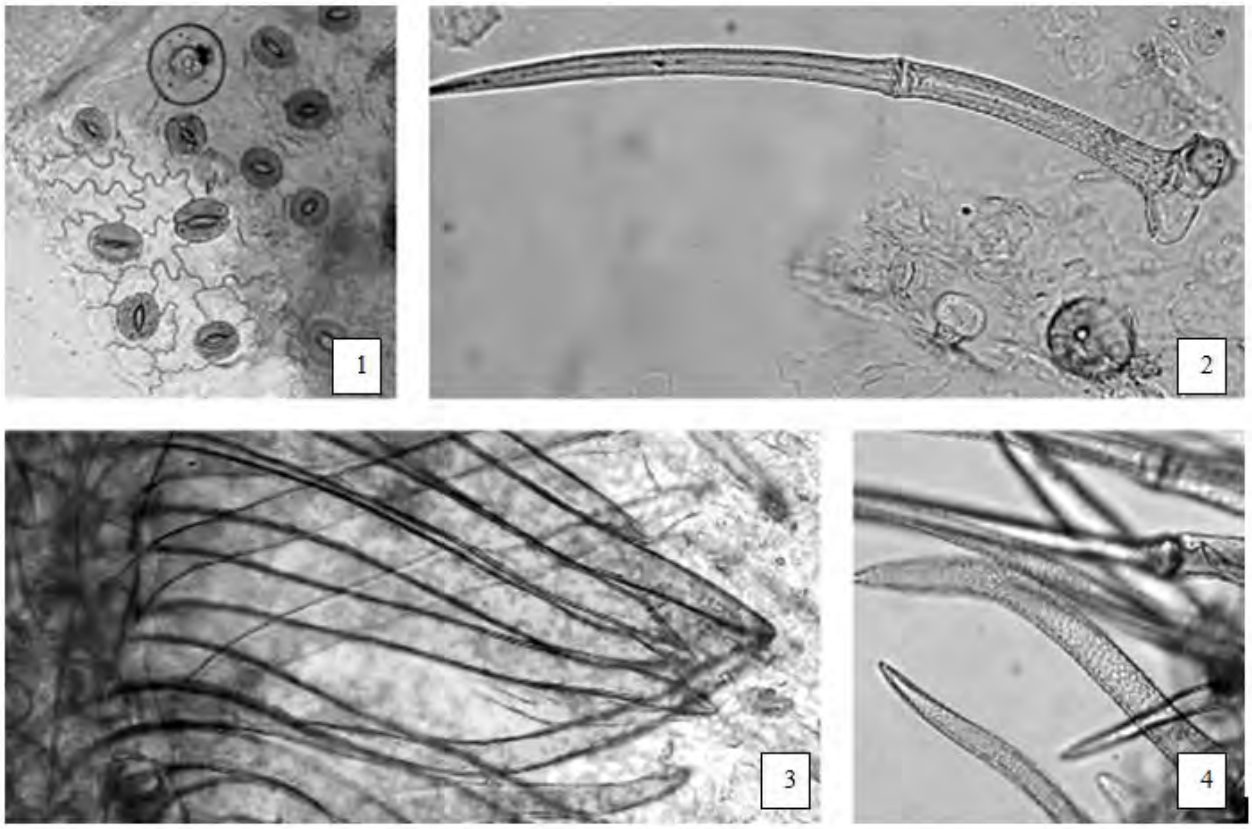
Венчик цветка с внешней стороны густо покрыт волосками. Эпидермис верхней губы венчика состоит из клеток удлиненной формы (внешняя сторона) и более мелких клеток изодиаметрической формы (внутренняя сторона) с извилистыми стенками. На внешней стороне верхней губы находятся волоски, простые одноклеточные и многоклеточные, состоящие из 2–6 (реже 8) клеток, с бородавчатой поверхностью, а также головчатые волоски. Присутствуют эфирномасличные железки. Большое количество простых одноклеточных и многоклеточных бородавчатых волосков обнаруживается по краю верхней губы. С внутренней стороны встречаются редкие простые одноклеточные и многоклеточные волоски, состоящие из 2–4 клеток, а также головчатые волоски. Эпидермис лопастей нижней губы венчика состоит из клеток изодиаметрической формы с прямыми стенками. На внешней стороне волоски простые одноклеточные, часто изогнутые, многоклеточные– из 2–3 клеток, головчатые волоски и эфирномасличные железки. Волоски на внутренней стороне преимущественно простые одноклеточные с бородавчатой поверхностью и головчатые. Около края и по краю нижней губы с обеих сторон волосков и железок не обнаруживается. В мезофилле присутствуют мелкие друзы оксалата кальция. Клетки эпидермиса трубки венчика с обеих сторон имеют удлиненную или изодиаметрическую форму и прямые стенки. На внешней стороне трубки представлены простые одноклеточные и многоклеточные волоски, состоящие из 2–3 клеток, часто изогнутых, а также головчатые волоски. Обнаруживаются эфирномасличные железки. На внутренней стороне трубки в верхней части присутствуют

редкие простые волоски, состоящие из 1–2 клеток, а также головчатые волоски и эфирномасличные железки, а в центральной части – значительное количество простых одноклеточных, часто изогнутых тонкостенных волосков.

Клетки эпидермиса чашелистика с 2 сторон имеют удлиненно-вытянутую или изодиаметрическую форму с извилистыми или слабо извилистыми стенками. На внешней стороне присутствуют устьица аномоцитного типа и множество волосков, простых одноклеточных и многоклеточных с бородавчатой поверхностью, а также головчатые волоски. Простые многоклеточные волоски состоят из 2–6 клеток и в значительном количестве обнаруживаются на верхушке чашелистика и по краю зубца; в основании, а также в центральной части и по ходу жилок присутствует большое количество механических волокон. На внутренней стороне чашелистика встречаются волоски, простые бородавчатые одноклеточные и многоклеточные, состоящие из 2–5 клеток, а также головчатые волоски и эфирномасличные железки.Пыльца округлая, трехгранная гладкая трехбороздная.

При рассмотрении «давленого» препарата цветоножки и стебля хорошо видны клетки эпидермиса изодиаметрической или удлиненно-прямоугольной формы с прямыми стенками; обнаруживаются основные диагностические признаки (тип устьичного аппарата, волоски, эфирномасличные железки), характерные для листа пустырника; в состав проводящих пучков входят спиральные, лестничные и сетчатые сосуды.

*Порошок.*В порошке видны фрагменты эпидермиса с устьицами, простыми одноклеточными и многоклеточными волосками с бородавчатой поверхностью; эфирномасличные железки, состоящие из 4–6 выделительных клеток и одноклеточной ножки; пыльца округлая, трехгранная гладкая трехбороздная. Обнаруживаются также фрагменты стебля и цветка, содержащие основные диагностические признаки (тип устьичного аппарата, волоски, железки), характерные для листа пустырника.



Рисунок–Пустырника трава.

1 – фрагмент эпидермиса (нижняя сторона) с извилистыми стенками, устьицамианомоцитного типа, эфирномасличной железкой (200×), 2 –простой многоклеточный бородавчатый волосок и головчатый волосок (200×), 3 – фрагмент трубки венчика цветка с простыми одноклеточными тонкостенными волосками (200×), 4 – фрагмент верхней губы венчика цветка с простыми одноклеточными грубобородавчатыми волосками (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов

Раствор стандартного образца (СО) метилового красного. Около 0,002 г метилового красного растворяют в 10 мл спирта 96 %.Срок годности растворане более 6 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор СО суданакрасного G. Около 0,0025 г судана красного G растворяют в 10 мл спирта 96 %.Срок годности растворане более 6 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около 1,0 г сырья,измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм,помещают в колбу со шлифом вместимостью100 мл, прибавляют 10 мл спирта 70 % и нагревают при температуре (40±5) °С, постоянно перемешивая, в течение 30 мин. После охлаждения до комнатной температуры полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 20 мкл испытуемого раствора и по 5 мкл раствора СО метилового красного и раствора СО судана красного G. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре в течение 10 мин, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 30 мин смесью растворителей толуол – этилацетат – уксусная кислота ледяная (70:25:5) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и обрабатывают диметиламинобензальдегида раствором 2 %.

Пластинку просматривают при дневном свете. При необходимости слегка подогревают при температуре около 80 °С в течение 2–3 мин.

На хроматограмме растворов СО метилового красного должна обнаруживаться зона адсорбции розового или красного цвета и над ней зона адсорбции красного или коричневато-красного цвета (судан красный G).

На хроматограммеиспытуемого раствора практически сразу появляются две зоны адсорбции розового цвета между зонамиадсорбции СО метилового красного и СО судана красного G (возможно присутствие зоны адсорбции того же цвета ниже зоны адсорбции СО метилового красного), быстро меняющие цвет на серовато-синий; допускается обнаружение других зон адсорбции (иридоиды).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* – не более 13 %.

Зола общая. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* – не более 12 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* –не более 6 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %. *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Сырье, изменившее окраску (потемневшее и почерневшее).*Цельное сырье, измельченное сырье* –не более 7 %.

Стебли.*Цельное сырье* – не более 46 %.

Кусочки стеблей.*Измельченное сырье* –не более 46 %.

Органическая примесь.*Цельное сырье,измельченное сырье* –не более 3 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* –не более 1 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. Определение проводят согласно ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радиоактивность.Определение проводят согласно ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. Определение проводят согласно требованиям ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных

препаратах».

Микробиологическая чистота. Определение проводят согласно ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение.*Цельное сырье, измельченное сырье, порошок:*сумма флавоноидов в пересчете на рутин –не менее 0,2 %; экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 70 %, –не менее 15 %.

Сумма флавоноидов

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм.Около 2,5 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл спирта 70 %, взвешивают с погрешностью ± 0,01 г и оставляют на 1 ч. Затем колбу соединяют с обратным холодильником, нагревают на водяной бане, поддерживая слабое кипение в течение 1 ч. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры, взвешивают, при необходимости доводят ее содержимое до первоначальной массы спиртом 70 %.Содержимое колбы фильтруют через бумажный складчатый фильтр, отбрасывая первые 25 мл фильтрата (раствор А).

2,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 % и доводят объем раствора до метки спиртом 96 %, перемешивают (раствор Б). Через 30 мин измеряют оптическую плотность раствора Б на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2 мл раствора А, 0,1 мл уксусной кислоты ледяной доведенный спиртом 96 %до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете нарутин и абсолютно сухое сырье в процентах (Х) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 2 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 625000}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)},$$

гдеA – оптическая плотность раствора Б;

$A_{1см}^{1\%}$–удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при длине волны 410 нм, равный 260;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %

Экстрактивные вещества.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1 из навески 1,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, экстрагент спирт 70 %).

Примечание.Определениесуммы флавоноидов в пересчете на рутин проводят в сырье, предназначенном для производства лекарственных растительных препаратов (пачки, фильтр-пакеты); определениеэкстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 70 %, проводят для сырья, предназначенного для производства экстрактов.

Упаковка, маркировка и транспортирование. Осуществляется в соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья».

Хранение. Хранение ЛРС осуществляется в соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Рапонтикума сафлоровидного корневище с корнями	**ФС**
Rhapontici carthamoidis rhizomata cum radicibus	**Взамен ФС 42-2707-99**

Собранные осенью, очищенные от остатков надземных частей и земли, промытые и высушенные корневища с корнями культивируемого или дикорастущего многолетнего травянистого растения рапонтикума сафлоровидного (син. Левзея сафлоровидная) - *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin (syn. *Leuzea carthamoides* (Willd.) DC), сем. астровых – *Asteraceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Корневище цельное или разрезанное, деревянистое, иногда с остатками стеблей длиной до 1 см, цилиндрическое, многоглавое разветвленное, снаружи неравномерно морщинистое, в изломе неровное, с многочисленными тонкими ветвящимися придаточными корнями. Корни упругие, мелкоборозчатые. Толщина корневищ до 3 см, длина корней – до 36 см. Цвет корневищ и корней снаружи от темного серовато-коричневого до почти черного, в изломе – бледно-желтый; часто встречаются корни с мелкими участками, лишенными коры. Запах слабый, своеобразный. Вкус слегка сладковатый, смолистый.

Измельченное сырье. Кусочки корней и корневищ различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет желтовато-

коричневый. Запах слабый, своеобразный. Вкус слегка сладковатый, смолистый.

Микроскопические признаки. Для приготовления препаратов используют корни диаметром 2-3 мм. На поперечном срезе видны следующие элементы. Покровная ткань – эпидермис; первичная кора широкая, состоит из округлоугловатых, тангентально вытянутых клеток, содержащих инулин в виде бесформенных, блестящих, сильно преломляющих свет «глыбок» (смотреть препарат без нагревания!). Вблизи эндодермы расположены крупные секреторные каналы в виде прерывистого пояса, они состоят из 4-5 крупных выделительных клеток, часто с мелкими каплями смолистого содержимого, окрашивающимися Суданом III в оранжево-красный цвет. Далее располагается эндодерма, клетки ее тангентально вытянуты, стенки утолщены. Клетки паренхимы вторичной коры значительно мельче, изредка встречаются одиночные призматические кристаллы и друзы оксалата кальция, линия камбия узкая. Древесина широкая, представлена в основном, одревесневшими волокнами (либриформом) и немногочисленными узкими сосудами и трахеидами. Сердцевинные лучи многорядные, клетки их вытянуты в радиальном направлении.

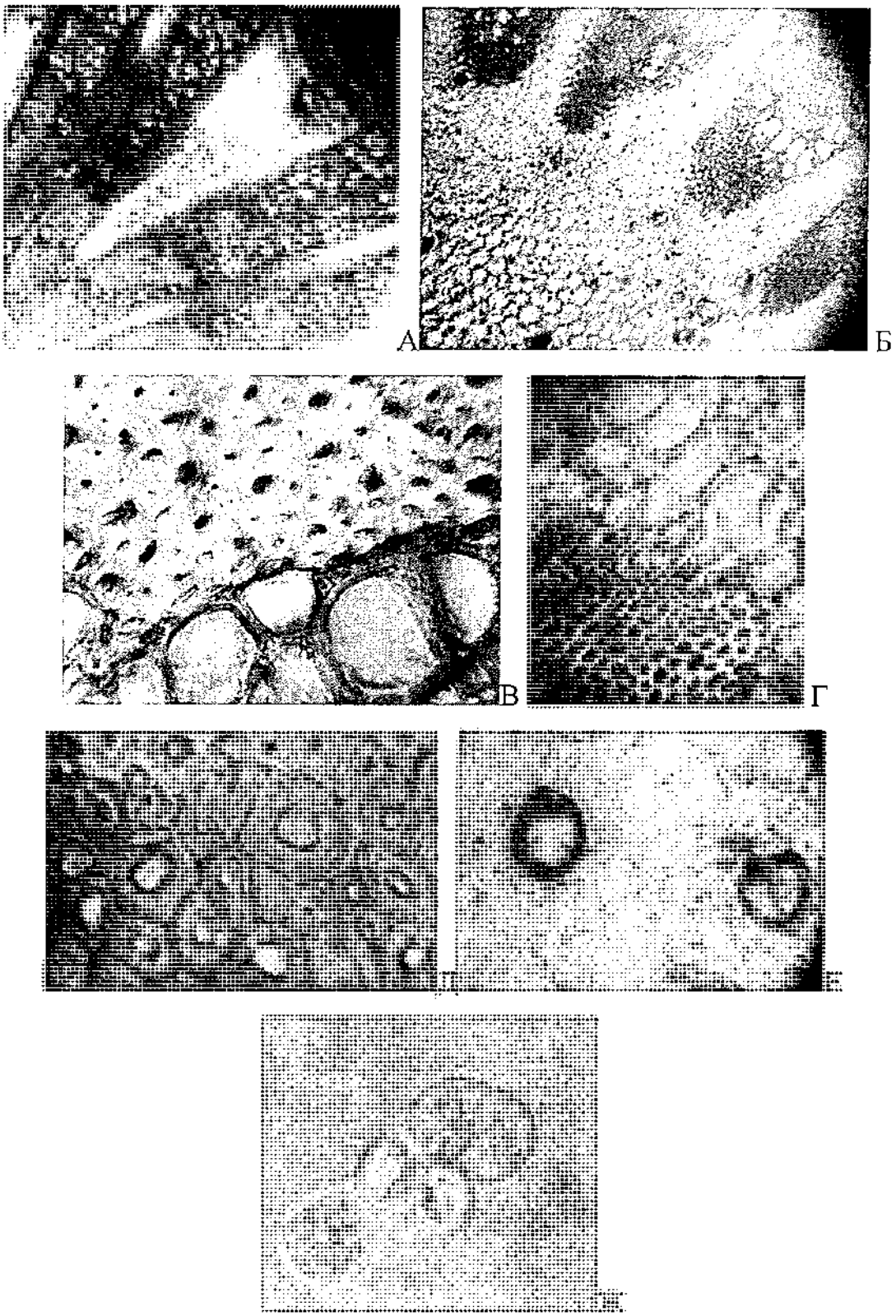


Рис.1. Поперечный срез корневища рапонтикума сафлоровидного: ксилема проводящих пучков (А), сердцевина (Б), либриформ и сосуды (В), первичная ксилема (Г), волокна (Д), схизогенные вместилища (Е), сферокристаллы инулина (Ж).

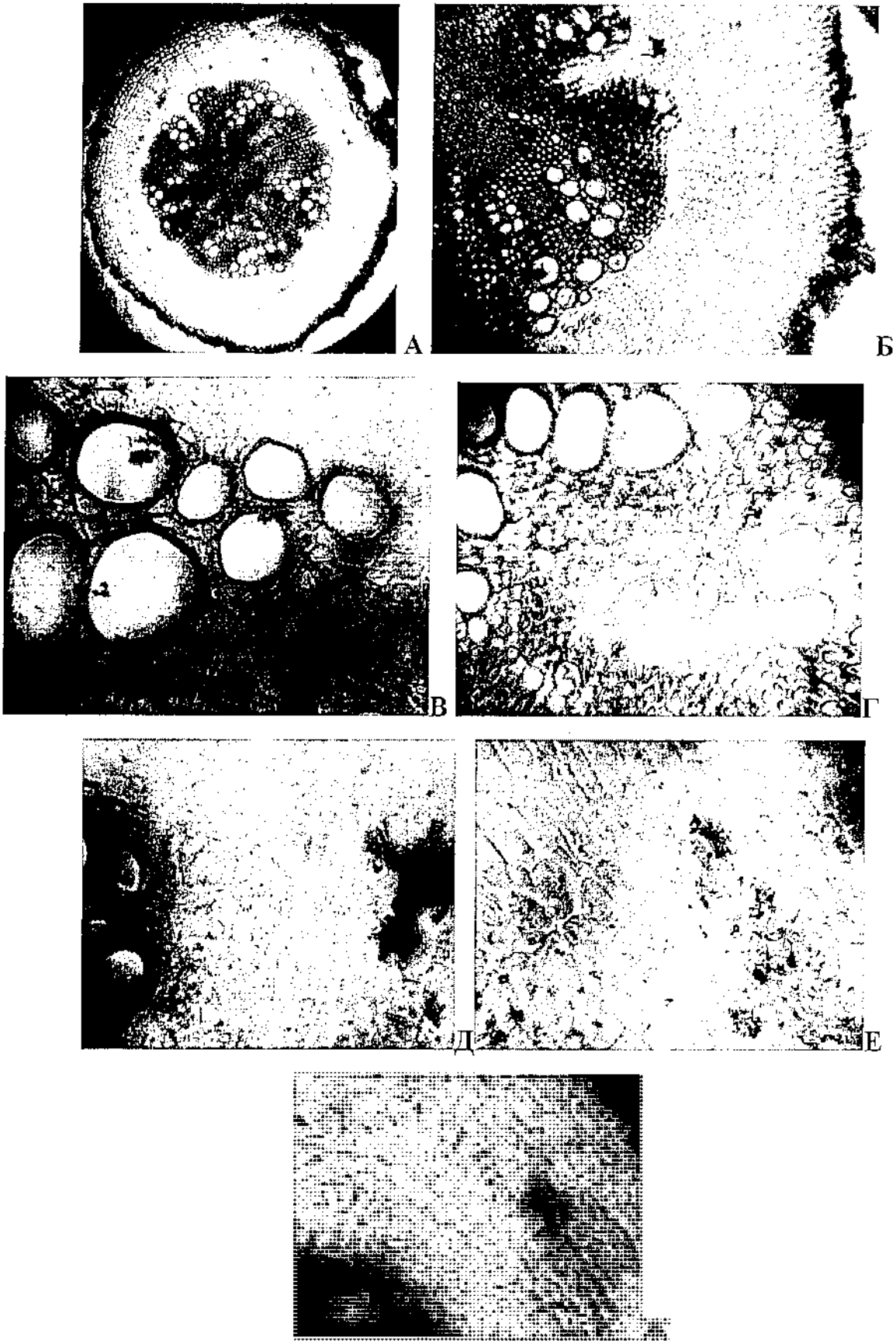


Рис.2. Поперечный срез корня рапонтикума сафлоровидного:
общая схема и фрагмент (А, Б), либриформ и сосуды (В,Г), флоэма (Д), схизогенные вместилища (Е, Ж).

Определение основных биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля на полимерной подложке размером 10 × 15 см наносят 15 мкл испытуемого раствора (см. раздел «Количественное определение»), 2 мкл раствора СО экдистена (экдистерона) (см. раздел «Количественное определение»). Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру со смесью растворителей хлороформ – метанол – ацетон (6:2:1) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, обрабатывают ванилина раствором 3 % в спирте 96 % и нагревают при температуре 105 - 110 °С в течение 2 мин.

На хроматограмме раствора СО экдистена (экдистерона) должна обнаруживаться зона адсорбции желтовато-зеленого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться не менее 2 зон адсорбции желтовато-зеленого цвета на уровне и выше зоны адсорбции СО экдистена (экдистерона).

Высокоэффективная жидкостная хроматография

На хроматограмме испытуемого раствора, полученной при количественном определении, время удерживания основного пика должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме СО экдистена (экдистерона).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 13 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 9 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 5 %.

Измельченность сырья. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 10 %; измельченных частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 20 %.

Посторонние примеси

Другие части растения *(остатки стеблей). Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 2 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 4 %.

Тяжелые металлы. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье*: экдистена – не менее 0,10 %.

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) экдистена. Около 0,01 г (точная навеска) СО экдистена помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в спирте 70 %, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Срок годности раствора 3 сут при хранении в защищенном от света месте.

Раствор ортофосфорной кислоты 0,05 %. К 1000 мл воды прибавляют 0,5 мл ортофосфорной кислоты, перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Проверка пригодности хроматографической системы.

Хроматографическая система считается пригодной, если для хроматограммы раствора СО экдистена выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по основному пику, должна быть не менее 30000 теоретических тарелок;
- фактор асимметрии (Т) основного пика не менее 0,8 и не более 1,5;
- относительное стандартное отклонение площади пика, рассчитанное по 5 повторным хроматограммам раствора СО экдистена, должно составлять не более 5 %.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 7,5 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в пакет из фильтровальной бумаги и помещают в экстрактор аппарата Сокслета с рабочим объемом около 150 мл. эстрагируют 120 мл метанолом в течение 7 час (25-30 сливов). Полученное извлечение количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора метанолом до метки и тщательно перемешивают. Полученный раствор фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм (испытуемый раствор).

20 мкл испытуемого раствора и 20 мкл раствора СО экдистена хроматографируют попеременно, получая не менее 5 хроматограмм раствора СО экдистена и не менее 3 хроматограмм испытуемого раствора в ниже приведенных хроматографических условиях.

Хроматографические условия:

Колонка	150 × 4,6 мм, октадецилсилилсиликагель для хроматографии (C_{18}), 3-5 мкм
Температура колонки:	комнатная
Режим элюирования:	градиентный
Подвижная фаза	A: ацетонитрил; B: ортофосфорной кислоты раствор 0,05 %;
Скорость подвижной фазы, мл/мин	1,0 мл/мин
Детектор	УФ-спектрофотометрический
Аналитическая длина волны	240 нм
Объем вводимой пробы, мкл	20,0
Время хроматографирования, мин	60

Программа градиента:

Ступень градиента	Продолжительность, мин	Подвижная фаза А	Подвижная фаза В
0	0	1	99
1	25	15	85
2	20	15	85
3	15	60	40

Содержание экдистена в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_{\text{о}} \cdot 100 \cdot P \cdot 100 \cdot 100}{S_{\text{о}} \cdot 50 \cdot a \cdot 100 \cdot (100 - W)},$$

где S – площадь пика экдистена на хроматограмме испытуемого раствора;
S_o – площадь пика на хроматограмме раствора СО экдистена,
a – навеска сырья, г;
$a_{\text{о}}$ – навеска СО экдистена, г;
P – содержание основного вещества в СО экдистена, %;
W – влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Расторопши пятнистой плоды **ФС.2.5.0035.15**

Silybi mariani fructus

Собранные зрелые и высушенные плоды культивируемого растения расторопши пятнистой – *Silybum marianum.* (L.) Gaertn., сем.астровых – *Asteraceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки.*Цельное сырье.* Плоды – семянки яйцевидной формы, слегка сдавленные с боков, длиной от 5 до 8 мм, шириной от 2 до 4 мм. Верхушка косоусеченная с выступающим тупым толстым остатком столбика и островершинным валиком вокруг него или без остатка столбика. Основание семянки тупое, рубчик щелевидный или округлый. Поверхность гладкая, иногда, продольно морщинистая, блестящая или матовая, часто пятнистая. На поперечном срезе плода под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×)видны перикарпий, плотно сомкнутый с семенной кожурой, и 2 семядоли зародыша. Цвет от черного до светло-коричневого, иногда с сиреневым оттенком, валик более светлый. Запах слабый. Вкус водного извлечения слегка горьковатый.

Микроскопические признаки.*Цельное сырье.*На поперечном и продольном срезах семянки должны быть видны семядоли, окруженные толстым слоем плотно сросшихся склереид, заметных по естественной желтой окраске. На поперечном срезе перикарпия видны слоя кутикулы, покрывающей неоднородный эпидермис, который со стороны основания семянки представлен небольшими толстостенными слабо-пористыми клетками, со стороны верхушки семянки переходящий в вытянутые

толстостенные клетки, покрытыетолстым слоем кутикулы. Устьица в эпидермисе плода отсутствуют. Непосредственно за эпидермисом расположен пигментный слой в 1 ряд тонкостенных, рыхлых клеток с бурым содержимым. За ним следует слой волокнистых клеток мезокарпия от 1 до 10 рядов, окрашиваемых анилина сульфатом в желтый цвет. Далее за слоем волокнистых клеток расположена семенная кожура, представленная мощным слоем склереид вытянутой формы с утолщенными стенками. За слоем склереид, в оболочке семянки, расположена паренхима плода, представленная полуразрушенными спавшимися клетками. Кожура сросшаяся с паренхимой внутренней части плода и состоит из нескольких рядов спавшихся клеток паренхимы семенной кожуры, а также спаянного с ней остатка эндосперма, представленного одним рядом крупных клеток, заполненных алейроновыми зернами. Основную массу семени составляют крупные семядоли, выполненные тонкостенными клетками запасающей паренхимы (вытянутой формы).

Клетки семядолей содержат жирное масло и алейроновые зерна округлой формы. В клетках запасающей паренхимы часто встречаются мелкие друзы оксалата кальция.

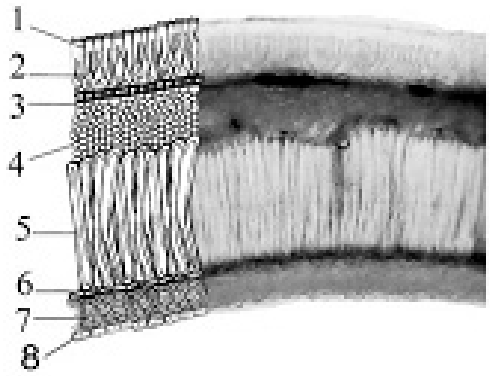


Рисунок – Расторопши пятнистой плод. Поперечный срез кожуры.
1 – кутикула, 2 – палисадоподобно вытянутые клетки эпидермиса, 3 – пигментный слой, 4 – волокнистые клетки, 5 – склереиды, 6 – спавшиеся клетки паренхимы плода, 7 – спавшиеся клетки паренхимы семенной кожуры, 8 – остаток эндосперма (100×)

Определение основных биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Около 1,0 г сырья, измельченного до величинычастиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм,помещают в колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 10 мл спирта 96 % и нагревают с обратным холодильником при умеренном кипении на водяной бане в течение 30 мин. Извлечение охлаждают и фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором наносят 10 мкл испытуемого раствора и рядом 20 мкл раствора стандартного образца (СО) силибина (см. раздел «Количественное определение» приготовление раствора АСО силибина).Пластинку с нанесенными пробами сушат, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 2 ч смесью растворителей углерода тетрахлорид – ацетонитрил (6:4), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм.

На хроматограмме растворов СО должна обнаруживатьсязона адсорбциифиолетового цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции фиолетового цвета на уровне зоны адсорбции СО силибина, допускается обнаружение других зон адсорбции.

Хроматограмму обрабатывают свежеприготовленным диазореактивом, выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100 - 105 °С в течение 5 мин.

На хроматограмме растворов СО должна обнаруживатьсязона адсорбции желто-оранжевого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции желто-оранжевого цвета на уровне зоны адсорбции СО силибина,

допускается обнаружение других зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье* – не более 12 %.

Зола общая.*Цельное сырье*–не более 6 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте.*Цельное сырье* –не более 4 %.

Посторонние примеси

Другие части растения.*Цельное сырье* – не более 2 %.

Органическая примесь.*Цельное сырье* – не более 0,5 %.

Минеральная примесь.*Цельное сырье* – не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье:*сумма флаволигнанов в пересчете на силибин –не менее 2,4 %, жирного масла –не менее 15 %, экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 80 %, – не менее 4 %.

Сумма флаволигнанов

Приготовление растворов.

Раствор СО силибина. Около 0,02 г (точная навеска) СО силибина растворяют в мерной колбе вместимостью 100 мл в 80 мл спирта 96 %, при нагревании на водяной бане при температуре от 70 до 80 °С. Раствор охлаждают, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор АСО силибина). Срок годности раствора 30 сут.

1,0 мл раствора А СО силибинапереносят в мерную колбу

вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор БСО силибина). Срок годности раствора 30 сут.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величинычастиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл и прибавляют 50 мл спирта 96 %. Колбу с содержимым присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане в течение 30 мин. Затем содержимое колбы охлаждают до комнатной температуры и фильтруют через бумажный фильтр с красной полосой в мерную колбу вместимостью 200 мл. Извлечение повторяют еще 2 раза вышеуказанным способом, после охлаждения фильтрата доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор А испытуемого раствора).

1,0 мл раствора А испытуемого растворапомещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Биспытуемого раствора).

Оптическую плотность раствора Биспытуемого раствора измеряют на спектрофотометре при длине волны 289 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют спирт 96 %.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО силибина в таких же условиях.

Содержание суммы флаволигнанов в пересчете на силибин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 25 \cdot 200 \cdot 1 \cdot 100 \cdot \mathrm{P} \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 25 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot a_0 \cdot \mathrm{P} \cdot 200}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где A– оптическая плотность раствора Биспытуемого раствора;
A_0– оптическая плотность раствора Б СО силибина;
a– навеска сырья, г;
a_0– навеска СО силибина, г;
P – содержание основного вещества в СО силибина, %;
W – влажность сырья, %.

Допускается содержания суммы флаволигнанов в пересчете на силибин

вычислять с использованием величины удельного показателя поглощения силибина по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 500000}{A_{1см}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где*A*– оптическая плотность раствора Биспытуемого раствора;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$–удельный показатель поглощения раствора силибина при длине волны 289 нм, равный 450;

a– навеска сырья, г;

W–влажность сырья, %.

Жирное масло

Около 5,0 г (точная навеска) сырья, измельченного до величинычастиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещают в пакет из фильтровальной бумаги. Пакет предварительно обезжиривают в аппарате Сокслета петролейным эфиром ($t_{кип}$ 40 – 70°С), сушат в сушильном шкафу при температуре около 80 °Св течение 2 ч, охлаждают в эксикаторе над кальция хлоридом безводным в течение 30 мин, взвешивают, помещают в аппарат Сокслета и заливают петролейным эфиром ($t_{кип}$ 40 – 70°С) в количестве, равном 2 объемам экстрактора.

Экстракцию проводят на водяной бане при температуре около 80 °С (3 – 4 слива в 1 ч)в течение 12 ч. Затем пакет вынимают и оставляют в вытяжном шкафу до полного удаления эфира, после чего сушат в сушильном шкафу при температуре 80 °Св течение 2 ч и после охлаждения в эксикаторе взвешивают на аналитических весах.

Содержание жирного масла в абсолютно сухом сырье в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(a_1 - a_2) \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot (100 - W)} = \frac{(a_1 - a_2) \cdot 10000}{a \cdot (100 - W)},$$

где *a*– навеска сырья до экстракции, г;

a_1– навеска сырья с пакетом до экстракции, г;

a_2– навеска сырья с пакетом после экстракции, г;

W – влажность сырья, %.

Экстрактивные вещества. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1, экстрагент – спирт 80 %).

Примечание. Определение суммы флаволигнанов проводится для сырья, предназначенного для производства лекарственных растительных препаратов (пачки, фильтр-пакеты) и экстрактов; определение экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 80 %, проводится для сырья, предназначенного для производства экстрактов, определение жирного масла – для сырья, предназначенного для получения жирного масла.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Ревеня длaневидного корни **ФС.2.5.0092.18**

Rhei palmatum radices **Взамен ГФ XI вып. 2 ст. 68**

Собранные осенью или ранней весной в возрасте не менее 3 лет, очищенные от гнилых частей, отмытые от земли, разрезанные на части и высушенные корни культивируемого растения ревеня длaневидного вар. тангутского – *Rheum palmatum* L. *var. tanguticum Maxim*., сем. гречишных – *Polygonaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Цельные или продольно разрезанные куски корней и корневищ различной формы длиной до 25 см, толщиной до 3 см. Крупные куски корней цилиндрические или конусовидные, прямые или слегка изогнутые, с продольно-морщинистой поверхностью. Куски корневищ встречаются редко, поверхность их поперечно-морщинистая, излом неровный.

Цвет корней с поверхности темно-коричневый, на изломе – желто-коричневый или оранжево-коричневый; свежий излом зернистый, сероватый, с оранжевыми или розоватыми прожилками.

Запах характерный. Вкус водного извлечения горьковатый, вяжущий.

Порошок. Смесь кусочков сырья различной формы, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

Цвет от светло-желтого, желто-коричневого, оранжево-коричневого до темно-коричневого с сероватыми, розоватыми или оранжевыми вкраплениями.

Запах характерный. Вкус водного извлечения горьковатый, вяжущий.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении

поперечного среза корня должен быть виден слой темно-коричневой пробки, состоящей из нескольких рядов клеток. Под пробкой располагается несколько слоев крупных тангентально вытянутых красно-коричневых клеток паренхимы с утолщенными стенками – феллодерма. Под феллодермой располагается паренхима, клетки которой очень крупные, богаты крахмалом. Крахмальные зерна – простые и 2 – 5-сложные, 2 – 40 мкм в диаметре. Сердцевинные лучи, воронковидно-расширяющиеся к периферии, состоят из 2 – 4 рядов крупных радиально вытянутых клеток с желтоватым содержимым. Флоэма состоит из тонкостенных клеток, среди которых видны округлые вместилища со слизью. Линия камбия четко выражена. Древесина состоит из тонкостенных клеток паренхимы и крупных сосудов, лежащих одиночно или небольшими группами. В паренхимных клетках коры и древесины встречаются очень крупные друзы оксалата кальция.

Порошок. При рассмотрении микропрепаратов должны быть видны фрагменты клеток тонкостенной паренхимы, содержащей друзы оксалата кальция и мелкие крахмальные зерна; фрагменты сосудов; отдельные крупные друзы и крахмальные зерна; фрагменты темно-коричневой пробки, состоящей из клеток с прямыми стенками.

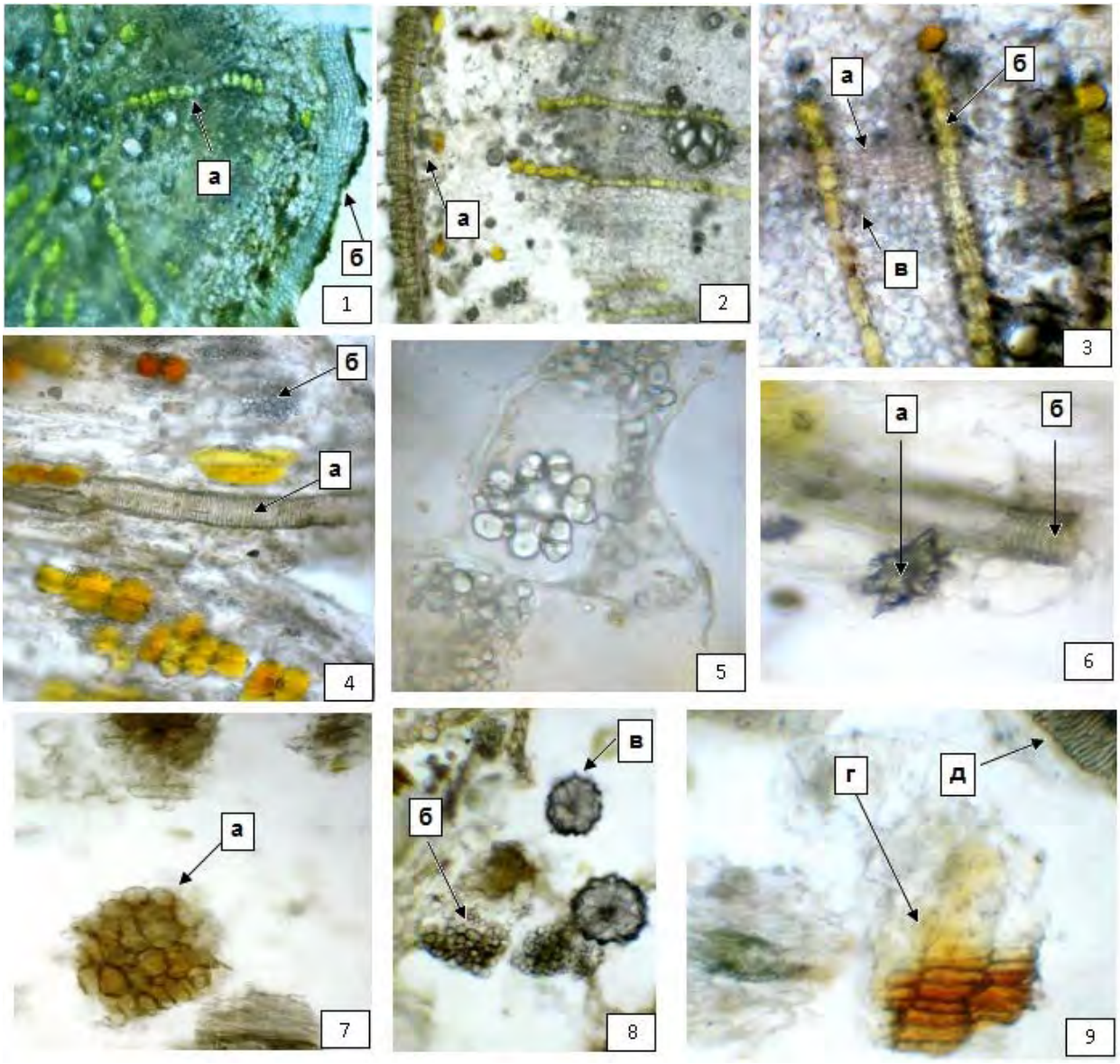


Рисунок 1 – Ревеня корни.

1 – фрагмент поперечного среза, общий вид: а – сердцевинные лучи, б – пробка (120×); 2 – фрагмент коры: а – феллодерма (120×); 3 – фрагмент поперечного среза: а – камбий, б – сердцевинные лучи, в – клетки паренхимы с друзами оксалата кальция, простыми и сложными крахмальными зернами (240×); 4 – фрагмент продольного среза: а – сосуды, б – крахмальные зерна (240×); 5 – крахмальные зерна (400×); 6 – фрагмент продольного среза: а – друзы оксалата кальция, б – сосуды (400×); 7, 8, 9 – фрагменты порошка: а - фрагмент пробки (вид с поверхности), б – крахмальные зерна, в – друзы оксалата кальция, г – фрагмент пробки (в поперечном сечении), д –фрагмент сосуда (400×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов

Раствор стандартного образца (СО) франгулаэмодина. 0,001 г СО франгулаэмодина растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора 1 мес.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г измельченного сырья помещают в коническую колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 10 мл спирта 70 % и настаивают в закрытой колбе при комнатной температуре в течение 1 часа. Полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 20 мкл (0,02 мл) испытуемого раствора, 15 мкл (0,015 мл) раствора СО франгулаэмодина. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 2 ч смесью растворителей: хлороформ – спирт 96 % (9:1), и хроматографируют восходящим способом.

Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, затем просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО франгулаэмодина должна обнаруживаться зона адсорбции красно-оранжевого или розовато-оранжевого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться основная зона адсорбции красно-оранжевого или розовато-оранжевого цвета на уровне зоны адсорбции СО франгулаэмодина; допускается обнаружение других зон адсорбции.

Качественная реакция

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г измельченного

сырья помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл горячей воды, нагревают на плитке в течение 30 мин. Полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр.

5 мл фильтрата помещают в пробирку, прибавляют 2 мл желатина раствора 1 %; при стоянии раствора должен наблюдаться образование объемного осадка белого цвета (дубильные вещества).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, порошок* – не более 12 %.

Зола общая. *Цельное сырье, порошок* – не более 8 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, порошок* – не более 1 %.

Измельченность сырья.

Цельное сырье. Частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм – не более 5 %.

Порошок: частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 3 %.

Посторонние примеси

Корней, почерневших в изломе – не более 5 %;

Корневища с остатками неотделенных стеблей. *Цельное сырье* – не более 5 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье* – не более 0,5 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье, порошок* – не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырьё, порошок:* производных антрацена в пересчете на франгулаэмодин - не менее 2 %.

Производные антрацена в пересчете на франгулаэмодин.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,16 мм. Около 0,5 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 50 мл, прибавляют 25 мл спирта 70 %. Колбу закрывают пробкой и взвешивают с точностью до ± 0,01 г, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 60 мин. Затем охлаждают в течение 30 мин, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр в колбу вместимостью 50 мл.

1,0 мл полученного фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора щелочно-аммиачным раствором до метки и перемешивают (раствор А). Раствор А помещают в колбу вместимостью 100 мл, нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 15 мин и затем охлаждают до комнатной температуры (испытуемый раствор).

После охлаждения измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 510 нм. В качестве раствора сравнения используют щелочно-аммиачный раствор.

Содержание суммы антраценпроизводных в пересчете на франгулаэмодин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 25 \cdot 50 \cdot 100}{A_{1см}^{1\%} \cdot 1 \cdot a \cdot (100 - W)}$$

где А – оптическая плотность испытуемого раствора;

$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения СО франгулаэмодина при длине волны 510 нм, равный 465;

25 – объем экстрагента, мл;

50 – объем раствора А, мл;

1 – объем фильтрата, используемого для получения раствора А, мл;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Родиолы розовой корневища и корни **ФС.2.5.0036.15**

Rhodiolae roseae rhizomata et radices

Собранные в фазу цветения и плодоношения, очищенные и отмытые от земли, разрезанные на куски и высушенные корневища и корни многолетнего дикорастущего или культивируемого травянистого растения родиолы розовой –*Rhodiola rosea* L., сем.толстянковых –*Crassulaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки.*Цельное сырье.* Куски корневищ и корней различной формы. Куски корневищ длиной до 9 см, толщиной 2–5 см, твердые, морщинистые, со следами отмерших стеблей и остатками чешуевидных листьев. От корневища отходят немногочисленные корни длиной 2–9 см, толщиной 0,5–1 см. Поверхность корневища и корня блестящая, серовато-коричневого цвета; при отслаивании пробки обнаруживается золотисто-желтый слой. Цвет на изломе коричнево-розовый, розовато-коричневый или светло-коричневый. Запах характерный.Вкус водного извлечения горьковато-вяжущий.

Измельченное сырье. Кусочки корневищ и корней различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7мм. Цвет коричнево-розовый или розово-коричневый с бело-розовыми, светло-желтыми, темно-коричневыми и коричневыми вкраплениями. Запах характерный.Вкус водного извлечения горьковато-вяжущий.

*Порошок.*Кусочки корневищ и корней различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2мм. Цвет коричнево-розовый или розово-коричневый с бело-розовыми, светло-желтыми, желтовато-розовыми,

желтыми, темно-коричневыми и коричневыми вкраплениями. Запах характерный.Вкус водного извлечения горьковато-вяжущий.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.*При рассмотрении микропрепаратов поперечного среза корневища должна быть видна слоистая перидерма. Корневище имеет пучковый тип строения. Проводящие пучки открытые, коллатеральные, веретеновидные, расположены кольцом, ориентированы к периферии корневища флоэмой и к центру – ксилемой. Возможно наличие второго кольца более мелких проводящих пучков, в которых флоэма ориентирована к центру, а ксилема – к периферии. Помимо сосудов и трахеид проводящего пучка могут встречаться очень узкие и короткие спиральные и кольчатые трахеиды, лежащие в межклетниках. Паренхима корневища состоит из крупных клеток, заполненных крахмалом. Клетки паренхимы часто окрашены в коричневый или красно-коричневый цвет (дубильные вещества).

В препаратах соскоба сухого сырья должны быть видны крахмальные зерна, простые, округлые, овальные или грушевидные, без заметной слоистости и трещинок.

Измельченное сырье, порошок. При рассмотрении «давленых» микропрепаратов должны быть видны многочисленные фрагменты спиральных, кольчато-спиральных и лестничных сосудов; группы склеренхимных волокон с утолщенными пористыми стенками; фрагменты слоистой пробки, состоящей из крупных клеток с неравномерно утолщенными стенками; округлые или удлиненные клетки паренхимы, нередко с клейстеризованными крахмальными зернами или коричневым содержимым (дубильные вещества); в межклетниках групп паренхимных клеток могут встречаться очень узкие и короткие спиральные и кольчатые трахеиды.

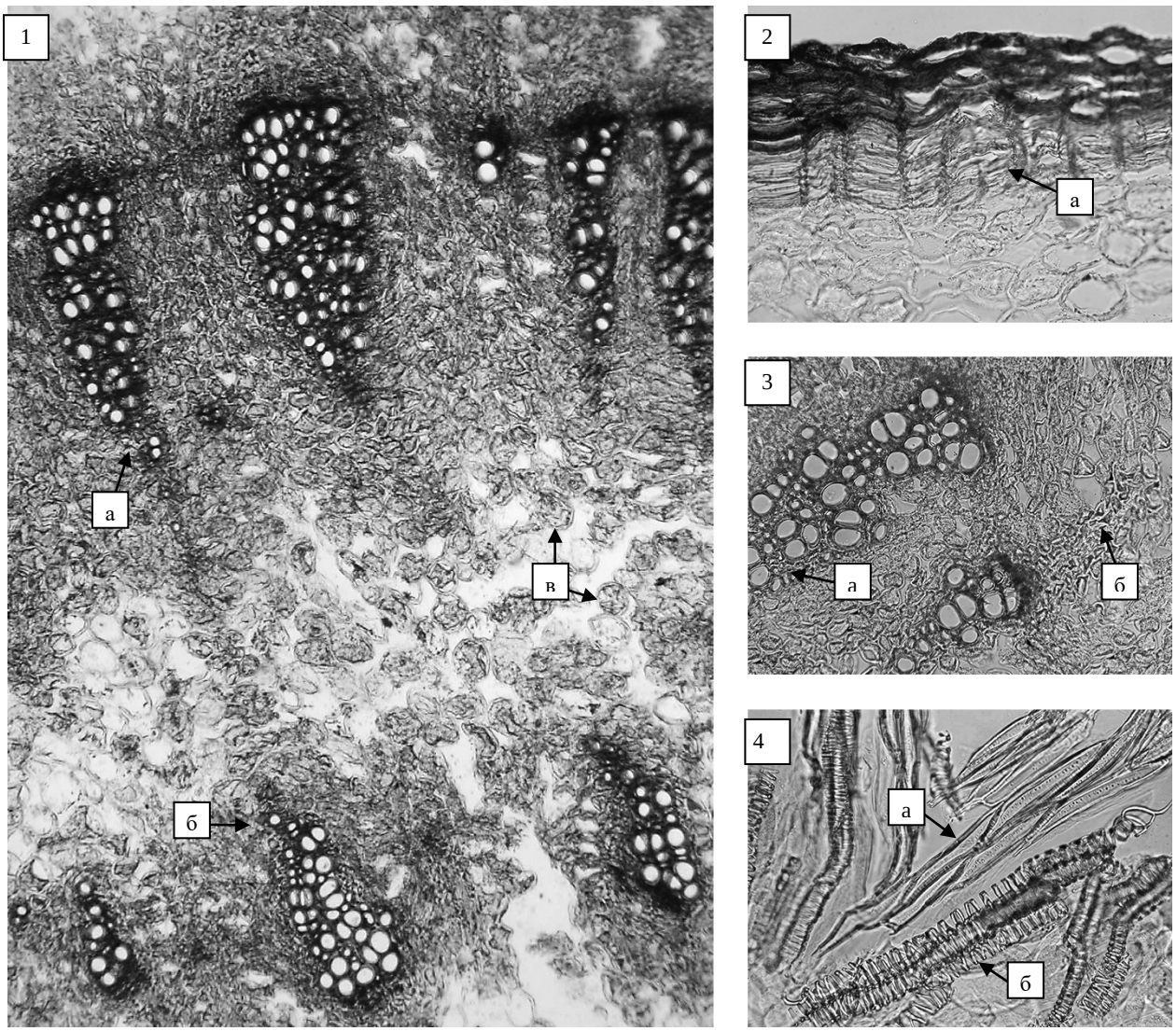


Рисунок 1 – Родиолырозовой корневища и корни.

1 – фрагмент поперечного среза корневища: а – сосудисто-волокнистые пучки первого кольца, б – сосудисто-волокнистые пучки второго кольца, в – клетки паренхимы (40×); 2 – фрагмент поперечного среза корневища: а – многослойная пробка (200×); 3 – фрагмент поперечного среза корневища, сосудисто-волокнистые пучки: а – сосуды ксилемы, б – флоэма (200×); 4 – «давленый» препарат: а – склеренхимные волокна с утолщенными пористыми стенками, б – фрагменты спиральных и лестничных сосудов (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

1. Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) розавина. Около4,0 мг СО розавина растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в хорошо укупоренной упаковке в прохладном, защищенном от света месте.

Около 1,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,25 мм, помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 70 - 80 мл спирта 70 %, закрывают пластмассовой пробкой и экстрагируют в течение 30 мин в ультразвуковой бане. Охлажденное до комнатной температуры извлечение вместе с частичками корневищ и корней, смывая их спиртом 70 %, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят спиртом 70 % до метки и тщательно перемешивают. Около 2 - 3 мл полученного раствора фильтруют через мембранный нейлоновый фильтр (размер пор 0,2 мкм), отбрасывая первые 1 - 2 мл фильтрата.

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором наносят по 40 мкл испытуемого раствора и раствора СО розавина.

Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре в течение 15 мин, помещают в камеру (предварительно выложенную изнутри фильтровальной бумагой и насыщенную не менее 1 ч) со смесью растворителей: хлороформ - спирт 96 % - вода (25:16:1) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, пластинку вынимают из камеры, сушат под тягой при комнатной температуре до удаления следов растворителей и просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм.

На хроматограмме раствора СО розавина должна обнаруживаться зона адсорбции фиолетового цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции фиолетового цветана уровне зоныадсорбции СО розавина; допускается обнаружение других зон адсорбции.

Далее пластинку обрабатываютанисового альдегида раствором уксуснокислым в этаноле, нагревают в сушильном шкафу в течение 2 - 3 мин при 100 - 105 ºС и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО розавина должна обнаруживаться коричневато-зеленая или зеленовато-серая зонаадсорбции.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться следующие зоны (снизу вверх от линии старта): сине- или серо-коричневая зона; коричневато-зеленая или зеленовато-серая зона (розавин); коричневая или красно-коричневая (салидрозид); допускается обнаружение других зон адсорбции.

2. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Времена удерживания основных пиков на хроматограмме испытуемого раствора должны соответствовать временам удерживания основных пиков на хроматограммах раствора СО розавина и раствора СО салидрозида.

Испытание проводят методом ВЭЖХ одновременно с количественным определением.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье*– не более 13 %; *измельченное сырье,порошок* –не более 12 %.

Зола общая. *Цельное сырье*– не более 9 %; *измельченное сырье,порошок* –не более 8 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* –не более 4 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 2 %. *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Другие части растения (листья, стебли, в том числе отделенные при анализе).*Цельное сырье* –не более 4 %.

Органическая примесь.*Цельное сырье,измельченное сырье* –не более 1 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* –не более 3 %.

Тяжелые металлы имышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок:*сумма гликозидов коричного спирта в пересчете на розавин- не менее 1 %, салидрозида - не менее 0,8 %.

Приготовление растворов.

Раствор СО розавина. Около 0,01 г (точная навеска) СО розавина растворяют в спирте 96 % в мерной колбе вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор АСО розавина).

10,0 мл раствора АСО розавина переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают(раствор БСО розавина*)*.Срок годности не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор СОсалидрозида. Около 0,01 г (точная навеска) СО салидрозида растворяют в спирте 96 % в мерной колбе вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор АСО салидрозида).

10,0 мл раствора АСО салидрозидапереносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают(раствор БСО салидрозида*)*.Срок годности не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Приготовление фосфатного буфера (pH 7,0).

1. 8,0 г натрия гидроксида растворяют в воде (около 500 мл), полученный раствор доводят водой до метки в мерной колбе вместимостью 1000 мл (раствор натрия гидроксида 0,2 М*)*.

Срок годности раствора 6 мес при хранении в хорошо укупоренной упаковке, в прохладном защищенном от света месте.

2. 6,8 г калия фосфата однозамещенного растворяют в 500 мл воды в мерной колбе вместимостью 2000 мл, затем добавляют 130 мл раствора натрия гидроксида 0,2 М, добавляют еще 800 мл воды и перемешивают. Значение pH определяют потенциометрически. При необходимости добавляют раствор натрия гидроксида 0,2 М и доводят объем раствора водой до метки.

Приготовленный раствор фильтруют под вакуумом через нейлоновый мембранный фильтр с размером пор не более 0,45 мкм.

Срок годности раствора 1 сут.

Проверка пригодности хроматографической системы.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

На хроматограмме раствора А испытуемого раствора (250 нм) в области пика, соответствующего по времени удерживания СО розавина, выходят не менее 3 пиков других гликозидов коричного спирта, из которых 1 слева и 2 справа от пика розавина.

На хроматограммах растворов СО число теоретических тарелок должно быть не менее 2000 для пика салидрозида и не менее 5000 для пика розавина.

На хроматограммах растворов СО фактор асимметрии (Т) для пиков салидрозида и розавина должен быть не менее 0,8 и не более 1,5.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,25 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 70 - 80 мл спирта 70 %, закрывают пластмассовой пробкой и экстрагируют в течение 30 мин в ультразвуковой бане. Охлажденное до комнатной температуры извлечение вместе с частичками корневищ и корней, смывая их спиртом 70 %, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят спиртом 70 % до метки и тщательно перемешивают. Около 3-5 мл полученного раствора

фильтруют через мембранный нейлоновый фильтр (размер пор 0,2 мкм), отбрасывая первые 1 - 2 мл фильтрата (раствор А испытуемого раствора).

Хроматографические условия

Колонка	250 × 4,0 мм, эндкепированныйоктадецилсилил(C_{18}) силикагель для хроматографии, 5 мкм
Предколонка	4 × 4 мм, эндкепированныйоктадецилсилил(C_{18}) силикагель для хроматографии, 5 мкм
Подвижная фаза	А - ацетонитрил; В- фосфатный буфер (pH 7,0).
Способ элюирования	Градиент

Время	**А, об. %**	**В, об. %**
0	11	89
10	11	89
30	30	70
35	60	40
45	60	40
50	11	89
70	11	89

Скорость потока мл/мин	1,0
Температура колонки, °С	(50 ± 1)
Детектор	спектрофотометрический или диодная матрица 219 нм (определение салидрозида) 250 нм (определение суммы гликозидов коричного спирта в пересчете на розавин)
Объем вводимой пробы, мкл	10
Время хроматографирования,	35

мин

Хроматографируют последовательно не менее 3 раз растворы СО салидрозида(растворБСО салидрозида) и СО розавина (раствор БСО розавина) и вычисляют среднее значение площади пика для каждого СО.

Испытуемый раствор хроматографируют не менее 3 раз.

Идентификацию пиков на хроматограмме раствора Аиспытуемого раствора проводят по времени удерживания в сравнении с хроматограммамивнешних стандартов — растворов СО салидрозида и СО розавина.

Содержаниесалидрозидав абсолютно сухом сырье в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot a_0 \cdot 80 \cdot P}{S_0 \cdot a_1 \cdot (100 - W)},$$

где: S_1 – площадь пика салидрозида в растворе Аиспытуемогораствора;
a_0 – навеска СО салидрозида, г;
P – содержание салидрозида в СО, %;
S_0 – площадь пика СО салидрозида;
a_1 – навеска сырья, г;
W – влажность сырья, %.

Гликозидам коричного спирта соответствуют четыре пика, выходящие вплотную друг за другом: пик розавина (имеет самую большую площадь), один пик слева от него и два пика справа от него (рис.).

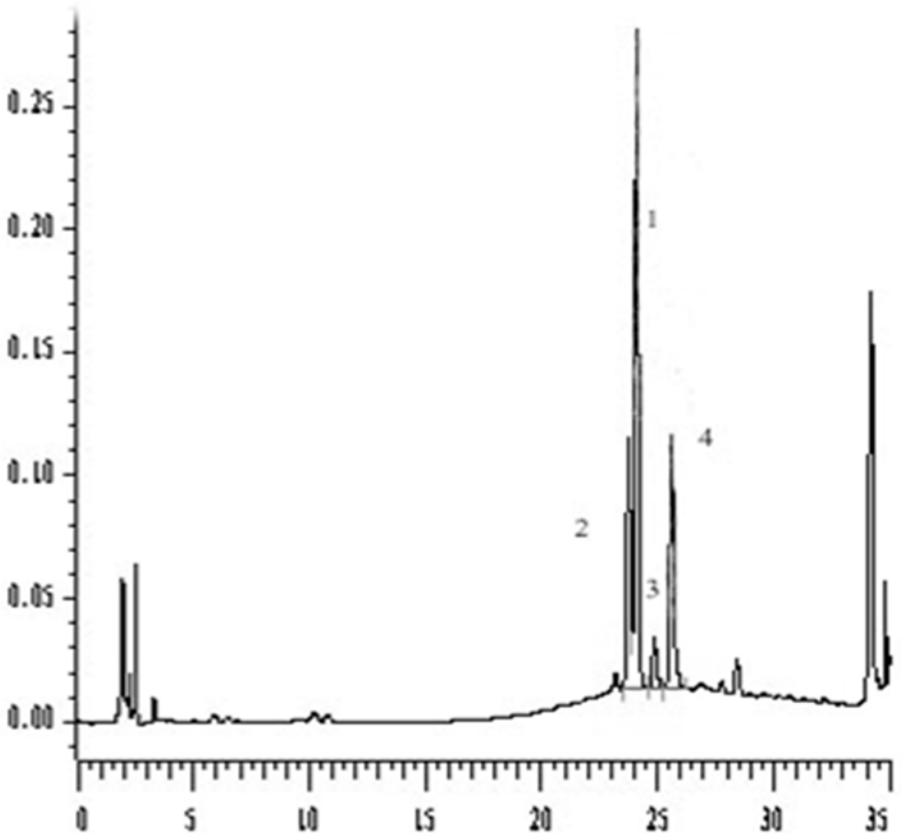


Рисунок -Хроматограммараствора Аиспытуемого раствора при длине волны 250 нм (пик № 1 соответствует розавину)

Содержание суммыгликозидов коричного спирта в пересчете на розавинв абсолютно сухом сырье в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot a_0 \cdot 160 \cdot P}{S_0 \cdot a_1 \cdot (100 - W)},$$

где: S_1 – сумма площадей четырех пиков гликозидов коричного спирта в растворе Аиспытуемого раствора;

a_0 – навеска СО розавина, г;

P – содержание розавина в СО, %;

S_0 – площадь пика СО розавина;

a_1 – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, г.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Ромашки аптечной цветки **ФС.2.5.0037.15**

Chamomillae recutita flores

Собранные в начале цветения и высушенные цветки (цветочные корзинки) культивируемого и дикорастущего однолетнего травянистого растения ромашки аптечной (ромашки ободранной) – *Chamomilla recutita (*L.*)* Rauschert *(Matricaria recutita* L.*, M. chamomilla* L.*),* сем.астровых – *Asteraceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки.*Цельное сырье.* Цельные или частично осыпавшиеся цветочные корзинки полушаровидной или конической формы, без ребристых цветоносов или с их остатками не длиннее 3 см. Корзинка состоит из краевых язычковых пестичных и срединных обоеполых трубчатых цветков. Цветоложе голое, мелкоямчатое, полое, в начале цветения полушаровидное, к концу – коническое. Обвертка корзинки черепитчатая, многорядная, состоящая из многочисленных продолговатых, с тупыми верхушками и широкими пленчатыми краями листочков. Размер корзинки (без язычковых цветков) 4–8 мм в поперечнике. Цвет язычковых цветков белый, трубчатых – желтый, обвертки – желтовато-зеленый, цветоносов – от светло-зеленого до зеленовато-коричневого. Запах сильный, характерный.Вкус водного извлечения пряный, горьковатый, слегка слизистый.

Измельченное сырье. Кусочки цветочных корзинок и их частей, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм.

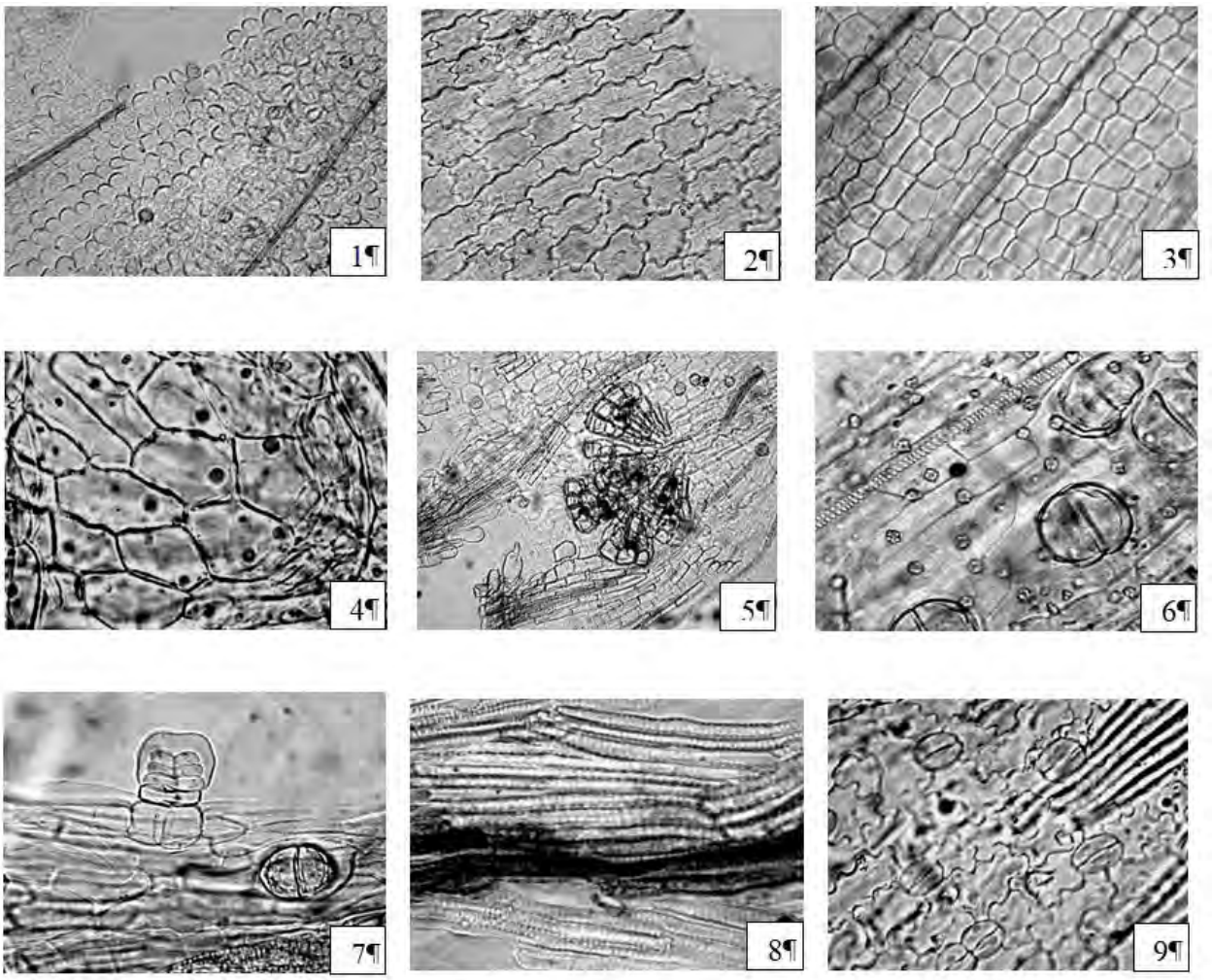
При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×)

видны: кусочки цветочных корзинок конической, реже полушаровидной формы с черепитчатой многорядной обверткой, отдельные листочки обвертки желтовато- или серовато-зеленого цвета продолговато-яйцевидной формы с тупыми верхушками, широким пленчатым краем и темной полосой по середине (секреторный ход); кусочки голого, мелкоямчатого, полого цветоложа серовато-зеленого или коричневато-серого цвета; язычковые цветки цельные пестичные или их части с белым или желтовато-белым лопатчатымтрехзубчатым отгибом; трубчатые цветки, обоеполые цельные, или их части с желтым пятизубчатым венчиком с длинной трубкой; кусочки зеленых, коричневато-зеленых, редко – коричневых линейных долей листьев, ребристых цветоносов и стеблей; мелкие серые или серовато-зеленые с беловатыми ребрышками незрелые семена.

Цвет измельченного сырья коричневато- или зеленовато-желтый с белыми, желтовато-белыми, желтыми, зелеными, зеленовато-коричневыми или коричневыми вкраплениями. Запах сильный, характерный. Вкус водного извлечения пряный, горьковатый, слегка слизистый.

Микроскопические признаки.*Цельное, измельченное сырье.* При рассмотрении частей цветочной корзинки должны быть видны извилистостенные клетки эпидермиса отгиба венчика язычковых цветков с сосочковидными выростами, клетки эпидермиса трубки венчика язычковых цветков – прямостенные. Клетки эпидермиса отгиба венчика трубчатых цветков вытянутые, слегка извилистостенные, в зеве – клетки эпидермиса прямостенные. В мезофилле трубчатых цветков содержатся мелкие друзы кальция оксалата. На поверхности язычковых и особенно трубчатых цветков, а также на листочках обвертки имеются эфирномасличные железки, состоящие из 6–8 клеток, расположенных в 2 ряда и в 3–4 яруса. Эпидермис листочка обвертки извилистостенный с многочисленными устьицами, окруженными 3–4 околоустьичными клетками эпидермиса (устьичный аппарат аномоцитного типа). По жилке листочка обвертки эпидермальные клетки сильно вытянутые с утолщенными стенками, пронизанными

многочисленными порами. Вдоль центральной жилки листочка обвертки и в цветоложе проходят секреторные ходы с маслянистым желтоватым содержимым. Пыльца – округлая шиповатая трехпоровая.



Рисунок–Ромашки аптечной цветки.
1 – фрагмент эпидермиса отгиба венчика язычкового цветка с сосочковидными выростами (200×), 2 –извилистостенные клетки эпидермиса отгиба венчика язычкового цветка (200×), 3 –прямостенные клетки эпидермиса трубки венчика язычкового цветка (300×), 4 – фрагмент эпидермиса отгиба венчика трубчатого цветка (300×), 5 – фрагмент эпидермиса в зеве венчика трубчатого цветка с пыльцой (200×), 6 – фрагмент эпидермиса трубчатого цветка с эфирномасличными железками (вид сверху) и друзами кальция оксалата (300×), 7 – фрагмент эпидермиса трубчатого цветка с эфирномасличными железками (вид сбоку и сверху) (300×), 8 – фрагмент эпидермиса по жилке листочка обвертки цветочной корзинки с секреторным ходом (300×), 9 –фрагмент эпидермиса листочка обвертки цветочной корзинки с устьицамианомоцитного типа (300×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) рутина.Около 0,001 г рутина (рутина тригидрата) растворяют в 10 мл спирта 96 %.Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор СО кверцетина. 0,001 г кверцетина (кверцетинадигидрата) растворяют в 10 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около 1,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл спирта 96 %, нагревают на водяной бане с обратным холодильником в течение 10 мин. После охлаждения до комнатной температуры полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 20 мкл испытуемого раствора ипо 10 мкл растворов СО рутина и СО кверцетина. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре в течение 5 мин, помещают в камеру, предварительно насыщеннуюне менее 30 мин и выложенной изнутри фильтровальной бумагой со смесью растворителей этилацетат - муравьиная кислота безводная - вода (40:4:6) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей.

Затем пластинку нагревают в сушильном шкафу в течение 2-3 мин при 100-105 ºС и еще теплую обрабатывают последовательно дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира раствором 1% в спирте 96 % и макрогола 400 раствором спиртовым 5 %, снова нагревают в сушильном шкафу в течение 1 мин при 100-105 ºС и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме растворов СО рутина и СО кверцетина должны обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией желтого или желто-

оранжевого цвета (рутин) и над ней зона адсорбции с флуоресценцией желтого или желто-оранжевого цвета (кверцетин).

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться следующие флуоресцирующие зоны адсорбции: одна или две зоны оранжевого или желтого цвета; выше расположены несколько зон (друг за другом) зеленого, голубого или голубовато-зеленого цвета; на уровне СО рутина и СО кверцетина могут быть видны бледные желтые или голубовато-желтые зоны; допускается обнаружение других зон адсорбции (флавоноиды).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье,измельченное сырье*–не более 14 %.

Зола общая. *Цельное сырье,измельченное сырье*–не более 12 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье,измельченное сырье*–не более 4 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:*частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм не более 5 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Листья, стебли, корзинки с остатками цветоносов длиннее 3 см.*Цельное сырье* – не более 9 %.

Корзинки, изменившие окраску (потемневшие и почерневшие). *Цельное сырье* – не более 5 %.

Органическая примесь.*Цельное сырье,измельченное сырье* –не более 3 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье,измельченное сырье*–не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье:* эфирного масла – не менее 0,3 %, суммы флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 1,2 %, экстрактивных веществ, извлекаемых водой, – не менее 18 %.

Эфирное масло

Определениеэфирного маслапроводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1 или 2, навеска15,0 гсырья,измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм,время перегонки – 2 ч, окраска полученного эфирного масла должна быть от голубой до синей).

Сумма флавоноидов

Приготовление растворов.

Раствор СО рутина. Около 0,05 г (точная навеска) СО рутина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 85 мл спирта 70 % и нагревают на водяной бане до полного растворения. Затем охлаждают, доводят объем раствора до метки тем же спиртом и перемешивают (растворАСО рутина). Срок годности раствора 30 сут при хранении в хорошо укупоренной упаковке, в прохладном защищенном от света месте.

1,0 мл раствора А СО рутина, 5 мл алюминия хлорида раствора 5 % в спирте 70 %, 2 капли уксусной кислоты разведенной 30%, помещают в

мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят спиртом 70 % до метки, перемешивают (раствор Б СО рутина).

Аналитическую пробу сырья измельчают до величинычастиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл спирта 70 % и взвешивают с погрешностью ± 0,01 г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на водяной бане в течение 45 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры, при необходимости доводят содержимое колбыспиртом 70 % до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр, смоченный тем же спиртом, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А испытуемого раствора).

3,0 мл раствора Аиспытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл алюминия хлорида раствора 5 % в спирте 70 % и через 10 мин прибавляют2 капли уксусной кислоты разведенной 30%,доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивают (раствор Б испытуемый раствор).

Оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора измеряют через 30 мин на спектрофотометре при длине волны 415 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из3,0 мл раствора А испытуемого раствора,2 капельуксусной кислоты разведенной 30%, доведенный спиртом 70 %до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО рутина в таких же условиях.В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из1 мл раствора А СО рутина, 2 капель уксусной кислоты разведенной 30%, доведенный спиртом 70 %до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете нарутини абсолютно

сухое сырье в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 25 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 100 \cdot P \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 25 \cdot 100 \cdot 3 \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot a_0 \cdot P \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 3 \cdot (100 - W)},$$

где *A* – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
A_0– оптическая плотность раствора Б СО рутина;
a – навеска сырья, г;
a_0– навеска СО рутина, г;
P – содержание основного вещества в СО рутина, %;
W – влажность сырья, г.

Допускается содержание суммы флавоноидов в пересчете нарутинвычислять с использованием удельного показателя поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридомпо формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1см}^{1\%} \cdot a \cdot 3 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 250000}{A_{1см}^{1\%} \cdot a \cdot 3 \cdot (100 - W)},$$

где *A* – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
$A_{1см}^{1\%}$–удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминияхлоридом при длине волны 415 нм, равный 248;
a– навеска сырья, г;
W – влажность сырья, %.

Экстрактивные вещества.Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных препаратах» (метод 1, экстрагент – вода очищенная).

Примечание. Определение эфирного масла, суммы флавоноидов в пересчете на рутин проводят в сырье, предназначенном для производства лекарственных растительных препаратов (пачки); определение экстрактивных веществ, извлекаемых водой, проводят в сырье, предназначенном для производства лекарственных растительных препаратов (пачки); определение эфирного масла проводят в сырье, предназначенном для получения препаратов со значительным содержанием эфирного масла.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование

лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Рябины обыкновенной плоды	**ФС.2.5.0093.18**
Sorbi aucupariae fructus	**Взамен ГФ XI ст. 39, Изменений N 1-4**

Собранные в период полного созревания и высушенные плоды дикорастущего и культивируемого дерева (реже кустарника) рябины обыкновенной – *Sorbus aucuparia* L., сем. розоцветных – *Rosaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Плоды яблокообразные без плодоножки, 2 – 5 гнездные, округлые или овально-округлые; с блестящей, реже матовой, сильно морщинистой поверхностью, в поперечнике до 9 мм, сильно морщинистые, на верхушке с остающейся чашечкой из пяти малозаметных смыкающимися зубчиков. В мякоти плода находятся от 2 до 7 слегка серповидно-изогнутых, продолговатых с острыми концами, гладких семян красновато-коричневого цвета.

Цвет плодов от красновато - или желтовато-оранжевого до коричневато-красного, иногда с беловатым налетом. Запах слабый, характерный. Вкус водного извлечения кисловато-горький.

При рассмотрении под лупой (10×) на поперечном срезе плода видно 2-5 семенных гнезд. Стенки гнезд хрящевые, твердые, сросшиеся с мякотью. Внутри каждого гнезда находятся 1-2 семени с твердой семенной кожурой красновато-коричневого цвета и семенным ядром белого цвета. Мякоть плода рыхлая, мясистая, сверху покрыта кожицей.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении «давленого» микропрепарата плода должны быть видны фрагменты эпидермиса, состоящего из округло-многоугольных клеток с толстыми пористыми, реже с

четковидноутолщенными стенками и хромопластами оранжево-желтого цвета в виде капель; фрагменты эпидермиса по краю остатков чашелистиков с устьицами аномоцитного типа и многоклеточными булавовидными или сосочковидными выростами, а также с одноклеточными длинными, тонкостенными, слегка извилистыми волосками. Мякоть плода состоит из тонкостенных паренхимных клеток различной формы с многочисленными хромопластами оранжево-желтого цвета. В ней встречаются одиночные или группы каменистых клеток, друзы оксалата кальция. В составе проводящих пучков встречаются спиральные сосуды, как правило, в сопровождении укороченных или удлиненных склереид, и, редко, призматических кристаллов оксалата кальция.

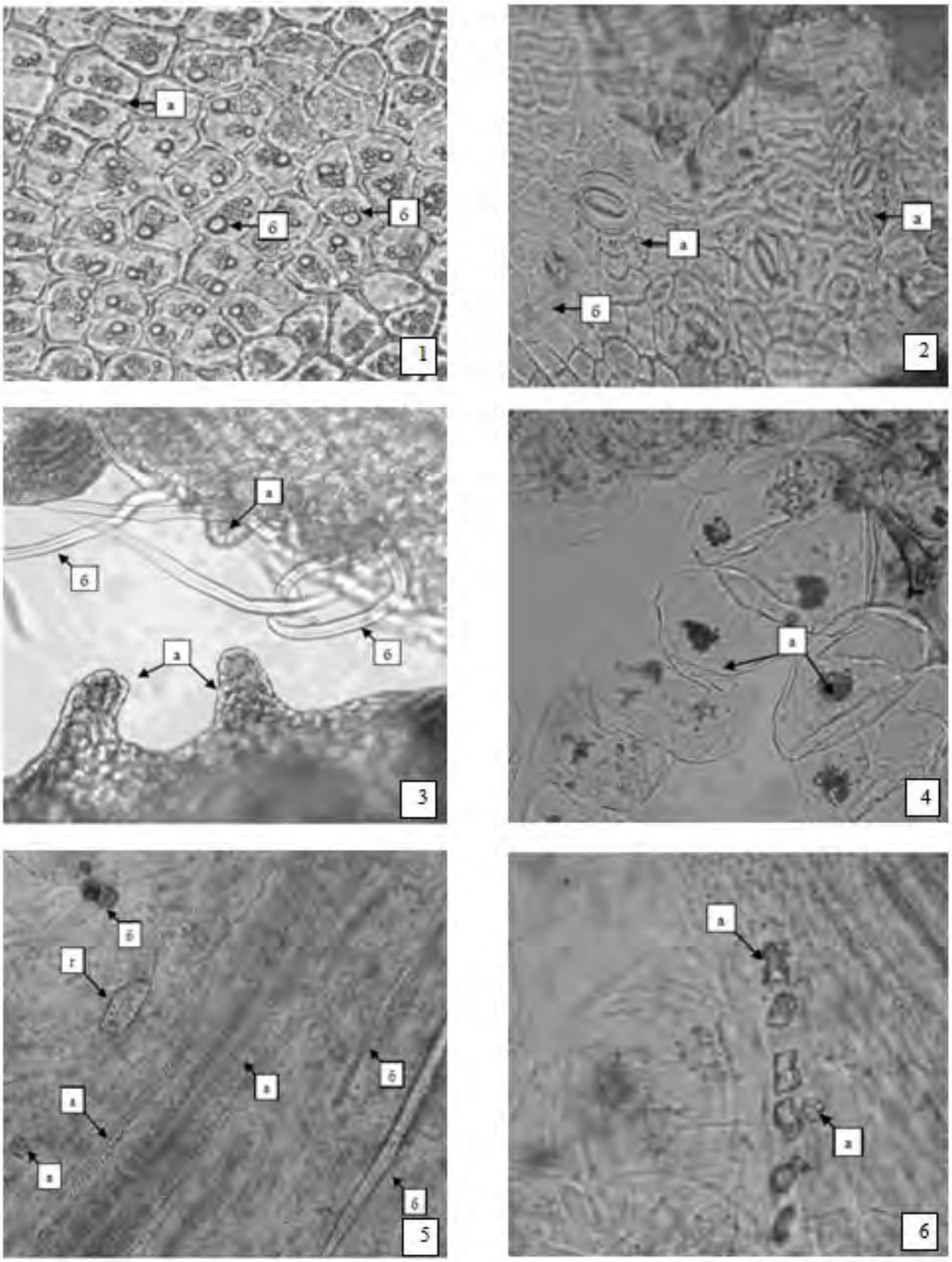


Рисунок – Рябины обыкновенной плоды.

1 – фрагмент эпидермиса плода: а – округло-многоугольные клетки с пористыми стенками, б –многочисленными оранжево-желтыми хромопластами, увел. 200×, 2 – фрагмент эпидермиса плода по краю остатков

чашелистиков: многоугольные клетки с устьицами [а] и пористыми стенками [б], увел. 200×, 3 – фрагментэпидермиса плода по краю остатков чашелистиков: а – многоклеточные сосочковидные выросты, б - одноклеточные волоски, увел. 200×, 4 – фрагментмякоти плода: клетки паренхимы с оранжево-желтымсодержимым [а], увел. 400×, 5 – фрагментмезокарпия плод: а – спиральные сосуды, б – склереиды, в – друзы оксалада кальция, г – каменистая клетка, увел. 200×, 6 – фрагмент мезокарпия плода: а – призматические кристаллы оксалата кальция, увел.400×.

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов

Раствор стандартного образца (СО) судана красного G. Около 2,5 мг СО судана красного G растворяют в 10 мл спирта 96 %. Срок годности раствора 6 мес при хранении в прохладном, защищённом от света месте.

Около 1,0 г измельченных плодов помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 5 мл спирта 96 % и нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 5 мин. После охлаждения содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 2 мкл (0,002 мл) испытуемого раствора и 2 мкл (0,002 мл) раствора СО судана красного G. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе и помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 40 мин, смесью растворителей: толуол – этилацетат – гексан - муравьиная кислота безводная (60:40:40:1) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей. Затем пластинку опрыскивают анисового альдегида раствором и выдерживают при температуре (100 – 105) °С в течение 2-3- мин и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО судана красного G должна обнаруживаться зона адсорбции розового, розово-красного или красного цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться не менее 4 зон адсорбции сине-фиолетового или фиолетового цвета (2 зоны адсорбции выше зоны адсорбции СО судана красного G и 2 зоны адсорбции ниже зоны адсорбции СО судана красного G); зона адсорбции синего цвета ниже зоны адсорбции СО судана красного G (вещества липофильного характера); допускается обнаружение других зон адсорбции.

Качественная реакция

Около 1,0 г измельченных плодов помещают в колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 30 мл спирта 70 % и нагревают на водяной бане при температуре 50 °С в течение 15 мин. Извлечение охлаждают до комнатной температуры и фильтруют через бумажный фильтр, упаривают на кипящей водяной бане до 1 мл. К полученному извлечению прибавляют 1 мл спирта 96 %, 0,1 г магния порошка и 1 мл хлористоводородной кислоты концентрированной; должно наблюдаться постепенное образование окрашивания розово-красного цвета (флавоноиды).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье* – не более 18 %.

Зола общая. *Цельное сырье* – не более 5 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье* – не более 2 %.

Посторонние примеси

Недозрелых плодов (светло-желтых, желтых). *Цельное сырье* – не более 2 %.

Почерневших и подгоревших плодов. *Цельное сырье* – не более 3 %.

Плодов с плодоножками. *Цельное сырье* – не более 3 %.

Других частей растения (плодоножек, веточек, листьев). *Цельное сырье* – не более 0,5 %.

Органическая примесь *Цельное сырье* – не более 0,5 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье* – не более 0,2 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье.* Сумма органических кислот в пересчете на яблочную кислоту – не менее 3,2 %.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с размером отверстий 1 мм. Около 5 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 200 мл воды очищенной, тщательно перемешивают и выдерживают на кипящей водяной бане в течение 2 ч. Затем извлечение охлаждают до комнатной температуры, фильтруют в мерную колбу вместимостью 250 мл, доводят объем содержимого колбы водой до метки и тщательно перемешивают.

1,0 мл полученного раствора переносят в колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 20 мл свежепрокипяченой воды, 1 мл фенолфталеина раствора спиртового 1 %, 2 мл метиленового синего раствора спиртового 0,1 % и титруют 0,1 М раствором натрия гидроксида до лилово-синего окрашивания в пене.

Содержание суммы свободных органических кислот в пересчете на яблочную кислоту в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{V \cdot 0{,}0067 \cdot 250 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot 10 \cdot (100 - W)} = \frac{V \cdot 1{,}675}{a \cdot (100 - W)},$$

где: V – объем 0,1 М раствора натрия гидроксида, пошедшего на титрование, мл;

0,0067 – количество яблочной кислоты, соответствующее 1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Сенны листья **ФС.2.5.0038.15**

Sennae folia

Собранные в фазу цветения и плодоношения, высушенные и обмолоченные листья дикорастущих и культивируемых многолетних кустарников кассии остролистной (сенны) – *Cassia acutifolia* Del. (*C. senna* L.) и кассии узколистной – *Cassia angustifolia* Vahl., сем. бобовых – *Fabaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки.*Цельное сырье.*Отдельные листочки и черешки сложного парноперистого листа, цельные или частично измельченные; кусочки тонких травянистых стеблей; бутоны; цветки и незрелые плоды. Листочки удлиненно-ланцетовидные (*Cassia angustifolia*) или ланцетоовальные (*Cassia acutifolia*), заостренные к верхушке, наиболее широкие в средней части, у основания неравнобокие, тонкие, ломкие, цельнокрайние, с очень коротким черешком. Вторичные жилки, ясно заметные с обеих сторон, отходят под острым углом от главной жилки и соединяются между собой дугами, идущими параллельно краю листочка. Длина листочка 1–6 см (2–6 см у *Cassiaangustifolia* и 1–3,5 см у *Cassiaacutifolia*), ширина 0,4–2 см (0,6–2 см у *Cassiaangustifolia* и 0,4–1,2 см у *Cassiaacutifolia*). Плод боб, плоский, кожистый, слабоизогнутый, 3–5 см длиной, 1,5–2 см шириной. Цвет листочков от серовато-зеленого (*Cassia acutifolia*) или желтовато-зеленого (*Cassia angustifolia*) до коричневато-зеленого (*Cassia acutifolia, Cassia angustifolia*), матовый, иногда верхняя и

нижняя стороны листочков различаются по цвету; плодов – зеленовато-коричневый с темными очертаниями семенных камер; стеблей – серовато-зеленый, зеленовато-коричневый, желтовато- или серовато-белый; бутонов – коричневато-зеленый, желтовато-зеленый; цветков – желтый.Запах слабый.Вкус водного извлечения слегка горьковатый, с ощущением слизистости.

Измельченное сырье. Смесь кусочков листочков, черешков, стеблей, лепестков, чашелистиков, створок плодов и семян, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки листочков серовато-зеленого, желтовато-зеленого, реже – коричневато-зеленого цвета, с ясно заметными жилками и мелкими беловатыми прижатыми волосками с обеих сторон; кусочки черешков и стеблей серовато-зеленого, зеленовато-коричневого, желтовато- и серовато-белого цвета; кусочки створок плодов (бобов) зеленовато-коричневого, темно-коричневого и желтовато-белого цвета; кусочки семян с морщинисто-извилистой поверхностью, как правило, серовато- или желтовато-зеленого цвета; стекловидные кусочки эндосперма сероватого или желтоватого цвета; кусочки лепестков венчика желтого или светло-желтого цвета с коричневато-фиолетовыми прожилками и фрагменты чашечки.

Цвет измельченного сырья серовато-зеленый, светло-зеленый, желтовато-зеленый или коричневато-зеленый с желтыми, белыми и коричневыми вкраплениями. Запах слабый.Вкус водного извлечения слегка горьковатый, с ощущением слизистости.

*Порошок.*Смесь кусочков листочков, черешков, стеблей, лепестков, чашелистиков, створок плодов и семян, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

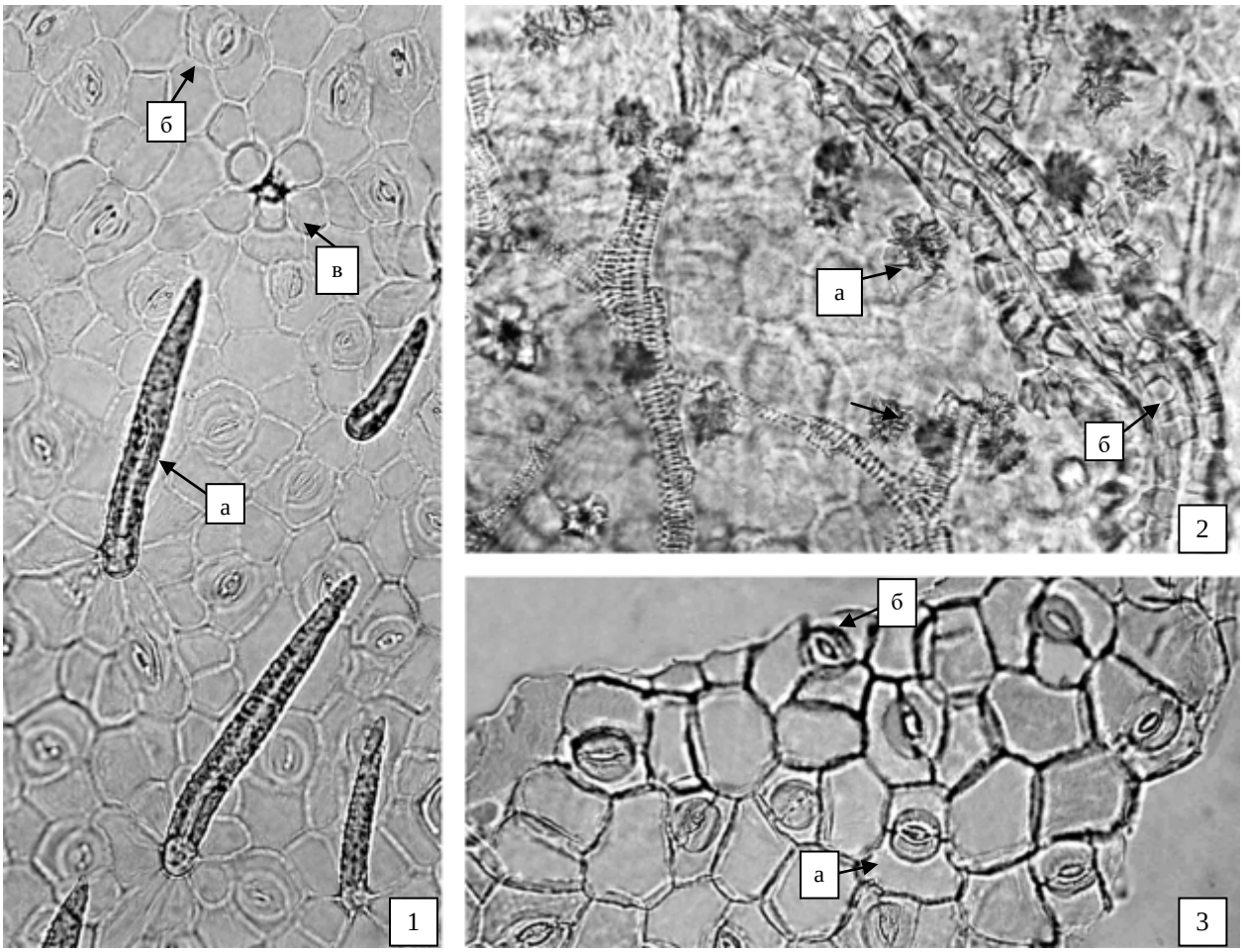
При рассмотрении порошка под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки листочков серовато-зеленого, желтовато-зеленого, реже – коричневато-зеленого цвета, с ясно заметными жилками и мелкими

беловатыми прижатыми волосками с обеих сторон; кусочки черешков и стеблей серовато-зеленого, зеленовато-коричневого, желтовато- и серовато-белого цвета; кусочки створок плодов (бобов) зеленовато-коричневого, темно-коричневого и желтовато-белого цвета; кусочки семян с морщинисто-извилистой поверхностью, как правило, серовато- или желтовато-зеленого цвета; стекловидные кусочки эндосперма сероватого или желтоватого цвета; кусочки лепестков венчика желтого или светло-желтого цвета с коричневато-фиолетовыми прожилками и фрагменты чашечки.

Цвет порошка серовато-зеленый, светло-зеленый или коричневато-зеленый с вкраплениями желтоватого, беловатого, коричневого и темно-коричневого цвета. Запах слабый.Вкус водного извлечения слегка горьковатый, с ощущением слизистости.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок.* При рассмотрении микропрепаратов должны быть видны: фрагменты листовой пластинки с эпидермисом из многоугольных прямостенных клеток; устьица окружены 2 (парацитный тип) или 3–5 (аномоцитный тип) клетками эпидермиса; волоски, простые одноклеточные толстостенные с бородавчатой поверхностью, как правило, серповидно-изогнутые, окружены розеткой клеток эпидермиса; в местах прикрепления опавших волосков в центре розетки видны округлые валики; вдоль жилок хорошо заметна кристаллоносная обкладка; в клетках мезофилла встречаются друзы оксалата кальция;лепестки или их фрагменты с эпидермисом из клеток с извилистым контуром, трудноразличимым из-за складчатой волнистой кутикулы; устьицааномоцитного типа; редко встречаются простые волоски; в мезофилле, особенно ближе к основанию лепестка, видны многочисленные друзы оксалата кальция;пыльники и их фрагменты с эпидермисом из извилистых клеток со складчатой кутикулой и клетками мезофилла с извилистыми пористыми утолщенными стенками; фрагменты эпидермиса створок плодов, состоящие из слегка вытянутых многоугольных прямостенных клеток с устьицами и простыми волосками,

изредка встречаются пузыревидные волоски; фрагменты мезокарпия, состоящего из перекрестно-расположенных волнистых волокон с кристаллоносной обкладкой; фрагменты семенной кожуры с эпидермисом из столбчатых клеток и клеток с выростами в виде присосок; группы мелких клеток эндосперма с маслянисто-зернистым содержимым; фрагменты черешков и стеблей– сосуды, спиральные и сетчатые с простыми или окаймленными порами, склеренхимные волокна с кристаллоносной обкладкой, клетки паренхимы почти прямоугольной формы с друзами оксалата кальция.



Рисунок–Сенны листья.

1 –фрагмент эпидермиса листа: а – простой бородавчатый волосок, б – устьица, с – округлый валик с розеткой клеток эпидермиса в месте прикрепления волоска (200×); 2 – фрагмент мезофилла листа: а – друза оксалата кальция, б – крупная жилка с кристаллоносной обкладкой (200×); 3 – фрагмент эпидермиса листа: а – устьицапарацитного типа, б –

устьицааномоцитного типа (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

1. ***Тонкослойная хроматография***

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) сеннозида В. Около 0,001 г СО сеннозида В растворяют в 5 мл смеси равных объемов спирта 96 % и воды и перемешивают. Срок годности раствора 3 мес при хранении в хорошо укупоренной упаковке, в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор СО барбалоина. Около 0,002 г барбалоина (алоина) растворяют в 1 мл спирта 70 % и перемешивают. Срок годности раствора 7 сут при хранении в хорошо укупоренной упаковке, в прохладном, защищенном от света месте.

Около 1,0 г сырья, измельченного до величинычастиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 25 мл смеси равных объемов спирта 96 % и воды и нагревают с обратным холодильником на водяной бане в течение 5 мин. После охлаждения полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят по 10 мкл испытуемого раствора и раствора СО сеннозида В, 5 мкл раствора СО барбалоина.Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре в течение 15 мин, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 60 мин смесью растворителей уксусная кислота ледяная – вода – этилацетат–пропанол(0,5:10:20:20), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80–90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, обрабатываютазотной кислотой разведенной 20 % и нагревают при температуре 100–105 °С в течение 10 мин. После охлаждения пластинкуобрабатываюткалия гидроксида раствором спиртовым 5 %и просматриваютпри дневном свете.

На хроматограмме растворов СО сеннозида Ви СО барбалоина должны обнаруживаться зона адсорбции коричнево-фиолетового или серо-фиолетового цвета (сеннозид В) и над ней зона адсорбции фиолетово-коричневого или коричневого цвета (барбалоин).

На хроматограмме испытуемого растворадолжны обнаруживаться: зона адсорбции коричнево-фиолетового или серо-фиолетового цветапримерно на уровне зоныадсорбции СО сеннозида В, выше нее 2 зоны адсорбции коричнево-фиолетового или серо-фиолетового цвета, над ними зона адсорбции красно-коричневого или коричневого цвета и примерно на уровне зоны адсорбции СО барбалоиназона адсорбции красно-коричневого или коричневого цвета; допускается обнаружение других зон адсорбции (антраценпроизводные).

2. ***Качественные реакции***

0,5 г сырья, измельченного до величинычастиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещают в колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 10 мл натрия гидроксида раствора спиртового 10 % и нагревают с обратным холодильником на плитке в течение 2 мин. В горячем состоянии извлечение фильтруют через складчатый бумажный фильтр в пробирку вместимостью 30 мл и охлаждают до комнатной температуры. В пробирку прибавляют хлористоводородную кислоту разведенную 8,3 % до слабокислой реакции (по лакмусовой бумаге синей),затемприбавляют 10 мл эфира и перемешивают, при этом эфирный слой окрашивается в зеленовато-желтый цвет. 5 мл эфирного извлечения взбалтывают с равным объемом аммиака раствора 10 %; последний окрашивается в вишнево-красный цвет (оксиантрахиноны).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* –не более 12 %.

Зола общая. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* –не более 12

%.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* –не более 4 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, – не более 3 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.*Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Кусочки стеблей толще 2 мм.*Цельное сырье, измельченное сырье* –не более 3 %.

Листочки и плоды. *Цельное сырье, измельченное сырье* –не менее 60 %.

Листочки, изменившие окраску (потемневшие и почерневшие).*Цельное сырье,измельченное сырье* –не более 3 %.

Органическая примесь.*Цельное сырье,измельченное сырье* –не более 3 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* –не более 1 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном

растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение.*Цельное сырье, измельченное сырье, порошок:* суммы агликонов антраценового ряда в пересчете на хризофановую кислоту – не менее 1,35 %.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величинычастиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм.Около 0,40 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл воды, перемешивают 10 мин и нагревают с обратным холодильником в водяной бане (уровень жидкости в колбе должен находиться на уровне поверхности воды) в течение 20 мин при периодическом перемешивании; после охлаждения под струей воды дают отстояться в течение 10 мин и фильтруют через бумажный складчатый фильтр.

25,0 мл фильтрата переносят в делительную воронку вместимостью 100 мл и дважды извлекают эфиром (порциями 40 и 20 мл). Фильтрат после экстракции помещают в колбу со шлифом вместимостью 200–250 мл. Объединенные эфирные извлечения дважды промывают водой по 10 мл. Воду отделяют и присоединяют к фильтрату в колбе со шлифом вместимостью 200–250 мл. Эфирные извлечения отбрасывают. Колбу с объединенными водными извлечениями нагревают на водяной бане до исчезновения запаха эфира, прибавляют 0,1 г натрия гидрокарбоната и 10 мл железа(III) хлорида раствора (плотность 1,07–1,08;9–10 %),присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане при периодическом перемешивании в течение 20 мин; затем прибавляют 5 мл серной кислоты раствора 50 % и продолжают нагревать еще 30 мин.

После охлаждения раствор переносят в делительную воронку вместимостью 300 мл, колбу ополаскивают 20 мл воды, затем 75 мл эфира;

промывную воду и эфир присоединяют к основному раствору в делительной воронке и перемешивают в течение 5 мин. После разделения эфирный слой переносят в делительную воронку вместимостью 500 мл, оставляя темные хлопья в водном слое; из водного раствора дважды повторяют извлечение эфиром (порциями 30и 20 мл). Объединенные эфирные извлечения фильтруют через стеклянный фильтр (ПОР 100), затем дважды промывают водой по 30 мл. К эфирному извлечению прибавляют 100 мл щелочно-аммиачного раствора и осторожно перемешивают в течение 5 мин. После отстаивания прозрачный водный слой сливают в мерную колбу вместимостью 250 мл, следя за тем, чтобы хлопья промежуточного слоя оставались в воронке. К эфирному извлечению прибавляют 20 мл воды и 3 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, воронку охлаждают под струей воды, смесь перемешивают в течение 2 мин и после разделения слоев водный слой сливают в ту же мерную колбу. Эфирное извлечение еще раз перемешивают с 50 мл щелочно-аммиачного раствора в течение 2 мин и после отстаивания водный слой сливают в ту же мерную колбу. Объединенные щелочно-аммиачные извлечения доводят щелочно-аммиачным раствором до метки и перемешивают (раствор А).

Через 15 мин измеряют оптическую плотность раствора А на спектрофотометре при длине волны 523 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения щелочно-аммиачный раствор.

Содержание суммы агликонов антраценового ряда в пересчете на хризофановую кислоту определяют одним из способов.

Расчет с использованием калибровочного графика. Концентрацию суммы агликонов антраценового ряда в растворе в пересчете на хризофановую кислоту определяют по калибровочному графику, построенному по растворам кобальта хлорида.

Построение калибровочного графика. Калибровочный график строят по растворам кобальта хлорида, исходя из того, что кобальта хлорида раствор 1 % по оптической плотности соответствует 4,3 мг хризофановой кислоты в

1 л щелочно-аммиачного раствора. Готовят кобальта хлорида растворы 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 и 4 %, которые имеют поглощение, соответствующее концентрациям хризофановой кислоты 4,3; 6,45; 8,6; 10,75; 12,9; 15,05 и 17,2 мг в 1 л. Измеряют оптическую плотность этих растворов на спектрофотометре при длине волны 523 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения воду. По оси ординат откладывают значения оптической плотности, а по оси абсцисс – концентрацию производных антрацена в миллиграммах на 1 л.

Содержание суммы агликонов антраценового ряда в пересчете на хризофановую кислоту в абсолютно сухом сырье в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{C \cdot 100 \cdot 250 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot 25 \cdot 1000 \cdot 1000 \cdot (100 - W)} = \frac{C \cdot 10}{a \cdot (100 - W)},$$

где *C* – концентрация суммы агликонов антраценового ряда, найденная по калибровочному графику, в мг на 1 л;
a – навеска сырья, г;
W – влажность сырья, %.

Допускается содержание суммы агликонов антраценового ряда в пересчете на хризофановую кислотувычислять с использованием величины удельного показателя поглощения по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100000}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 25 \cdot (100 - W)},$$

где *A*– оптическая плотность раствора А;
$A_{1\text{см}}^{1\%}$–удельный показатель поглощения хризофановой кислоты при длине волны 523 нм, равный 432;
a– навеска сырья, г;
W– влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных

препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Синюхи голубой корневища с корнями ФС.2.5.0039.15

Polemonii caerulei rhizomata cum radicibus

Собранные весной или осенью, отмытые от земли, высушенные цельные и измельченные корневища с корнями дикорастущего и культивируемого многолетнего травянистого растения синюхи голубой *Polemonium caeruleum* L., сем.синюховых – *Polemoniaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Цельные или разрезанные вдоль корневища с корнями. Корневища горизонтальные, прямые или слегка изогнутые, иногда ветвящиеся, с многочисленными придаточными корнями; длина корневищ 0,5–5 см, толщина 0,3–2 см. Поверхность корневищ морщинистая, излом ровный или зернистый. В центре корневищ часто имеется полость вследствие разрушения сердцевины. Корни тонкие, длиной 7–35 см, толщиной 1–2 мм, мелкие, шероховатые, цилиндрические, узловатые, ломкие. Цвет корневищ с поверхности сероватый, на изломе желтовато-белый или белый. Корни снаружи желтовато-белые, на изломе – белые. Запах слабый, характерный. Вкус водного извлечения горьковатый.

Измельченное сырье. Кусочки корневищ и корней различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.Цвет светло-серый или желтовато-серый. Запах слабый, характерный. Вкус водного извлечения горьковатый.

Порошок. Под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видна смесь частиц серовато-белого или желтовато-белого цвета с коричневато-серыми вкраплениями, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Запах

слабый, характерный. Вкус водного извлечения горьковатый.

Микроскопические признаки.*Цельное сырье.* На поперечном срезе корня видна покровная ткань, состоящая из 1–2 слоев округлых клеток эпидермиса с тонкими опробковевшими оболочками. Первичная кора состоит из крупных, тангентально вытянутых клеток с неравномерно утолщенными оболочками. Эндодерма хорошо выражена. Вторичная кора значительно уже первичной и состоит из мелких клеток – проводящих элементов луба и более крупных клеток лубяной паренхимы. Камбиальная зона слабо выражена. В древесине корня сосуды разного диаметра, располагаются без особого порядка, сердцевинные лучи незаметны. В паренхимных клетках коры и древесины содержатся капли жирного масла; изредка встречаются мелкие крахмальные зерна.

Покровная ткань представлена тонкой светлой двух-, трехслойной перидермой. Под пробковым слоем имеется слой гиподермы. Первичная кора тонкая, состоящая из однородных паренхимных клеток треугольной формы с крупными межклетниками, расположенными в 6–10 слоев. В клетках паренхимы встречаются зерна крахмала, капли жирного масла. Флоэма образована ситовидными трубками. Зона флоэмы узкая, на ее границе с первичной корой располагается эндодерма с выраженными поясками Каспари. Очертания ксилемы разнообразны: от очень широких участков до совсем узких. Границы между первичными и вторичными элементами ксилемы и флоэмы трудно различимы. На границе расположен секреторный слой. Камбиальная зона выражена состоит 3–5 слоев клеток. Проводящие пучки коллатеральные, открытые, расположены по кругу. Центр корневища занят округлой сердцевиной с однородными по форме и величинами клетками.

*Измельченное сырье.*При рассмотрении «давленого» микропрепарата под микроскопом видны крупные, тангентально вытянутые клетки первичной коры с неравномерно утолщенными оболочками с каплями жирного масла; изредка встречаются мелкие крахмальные зерна, обрывки

спиральных, реже сетчатых или лестничных сосудов. Клетки эндодермы крупные. Клетки эпидермиса имеют тонкие опробковевшие оболочки.

Порошок. Под микроскопом видны обрывки клеток эпидермиса с тонкими опробковевшими стенками, обрывки паренхимных клеток с крахмалом и каплями жирного масла, обрывки пористых и спиральных сосудов, обрывки эндодермы.

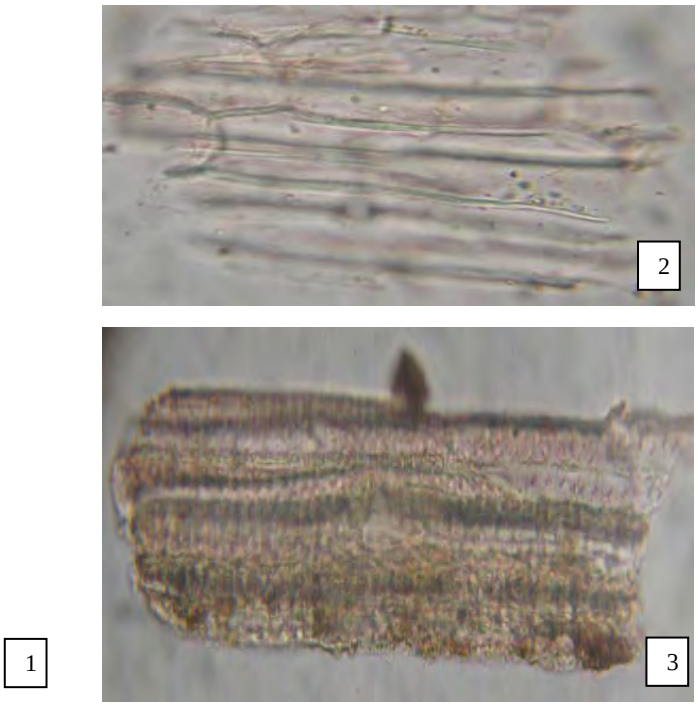


Рисунок –Синюхи голубой корневища с корнями.

1 - поперечный срез корня в растворе флороглюцина(90×); 2 -фрагмент первичной коры(125×); 3 - фрагмент проводящей системы (пористые и спиральные сосуды)(125×).

Определение основных групп биологически активных веществ

1. ***Тонкослойная хроматография***

Около 2,5 гсырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, помещают в колбу со шлифом вместимостью 50 мл, прибавляют 20 мл спирта 70 % и нагревают на водяной бане с обратным холодильником в течение 20 мин, затем охлаждают и

фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля на алюминиевой подложке размером 10 × 10 см наносят 4 мкл испытуемого раствора. Пластинку с нанесенной пробой сушат на воздухе и помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин смесью растворителей бутанол–спирт 96 %–аммиак (7:2:5), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, обрабатывают фосфорно-вольфрамовой кислоты спиртовым раствором 25 % и выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100 -105 °С в течение 5 мин.

На хроматограмме испытуемого раствора должно наблюдаться не менее 3 зон адсорбции коричневого цвета и над ними не менее 3 зон адсорбции розово-фиолетового цвета; допускается обнаружение других зон адсорбции.

2. ***Качественные реакции***

Аналитическую пробу сырья измельчают до величинычастиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 2,0 г измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл воды и нагревают на плитке при частом перемешивании в течение 10 мин, затем охлаждают и фильтруют через бумажный фильтр. 5 мл фильтрата помещают в пробирку и сильно встряхивают, образуется обильная и стойкая пена (сапонины).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* –не более 14 %.

Зола общая. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* –не более 13 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* –не более 7 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %. *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 1 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Корневища, потемневшие на изломе.*Цельное сырье* – не более 3 %.

Кусочки корневищ, потемневшие на изломе. *Измельченное сырье* –не более 3 %.

Корневища с остатками стеблей длиной свыше 10мм.*Цельное сырье* – не более 5 %.

Кусочки корней размером свыше 20 мм. *Измельченное сырье* –не более 5 %.

Органическая примесь.*Цельное сырье,измельченное сырье* –не более 1 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* –не более 2 %.

Тяжелые металлы и мышьяка. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение.*Цельное сырье, измельченное сырье, порошок:* суммы тритерпеновых сапонинов в пересчете на β-эсцин – не менее 10%;экстрактивных веществ, извлекаемых водой, – не менее 20 %.

Сумма тритерпеновых сапонинов

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО)β-эсцина. Около 0,05 г (точная навеска) СО β-эсцина, высушенного до постоянной массы, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 50–70 мл уксусной кислоты ледяной при перемешивании, доводят тем же растворителем до метки и снова перемешивают (раствор А СО β-эсцина).

5,0 мл раствора А СО β-эсцинапомещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора уксусной кислотой ледяной до метки и снова перемешивают (раствор Б СО β-эсцина). Срок годности раствора не более 30 сут.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величинычастиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 0,5 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в патрон из фильтровальной бумаги, экстрагируют хлороформом в аппарате Сокслета в течение 2 ч. Хлороформное извлечение отбрасывают, патрон с сырьем сушат до полного испарения хлороформа. Затем патрон с сырьем помещают в колбу вместимостью 250 мл, приливают 50 мл спирта 70 %, колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане в течение 1,5 ч. Полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр в круглодонную колбу для отгонки, патрон с сырьем дважды промывают спиртом 70 % порциями по 5 мл и фильтруют через тот же фильтр в ту же колбу. Полученное объединенное извлечение отгоняют с помощью роторного

испарителя досуха. Сухой остаток в колбе растворяют в уксусной кислоте ледяной, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем тем же растворителем до метки и перемешивают (раствор Аиспытуемого раствора).

1,0 мл раствора Аиспытуемого растворапомещаютв мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора уксусной кислотой ледяной до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора).

В колбу со шлифом помещают 2,0 мл раствора Б испытуемого раствора, прибавляют 2 мл уксусной кислоты ледяной и 2 мл серной кислоты концентрированной и кипятят с обратным холодильником в течение 1 ч, затем охлаждают и измеряют оптическую плотность полученного раствора В испытуемого растворапри длине волны 282 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 4 мл уксусной кислоты ледяной и 2 мл серной кислоты концентрированной, выдержанный в тех же условиях.

Параллельно в тех же условиях измеряют оптическую плотность раствора В СО β-эсцина, приготовленного в тех же условиях.

Содержание суммы тритерпеновых сапонинов в пересчете на β-эсцин в абсолютно сухом сырье в процентах *(X)* вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 5 \cdot 2 \cdot 25 \cdot 25 \cdot P \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 2 \cdot a \cdot 1 \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot a_0 \cdot P \cdot 10}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Виспытуемого раствора;
A_o – оптическая плотность раствора В СО β-эсцина;
a_o – навеска СО β-эсцина, г;
a – навеска сырья, г;
P – содержание основного вещества в СО β-эсцина, %;
W – влажность сырья, %.

Экстрактивные вещества.Определениепроводят в соответствии стребованиями ОФС «Определение содержаниеэкстрактивных веществ в лекарственном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1,

экстрагент - вода).

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Солодки корни **ФС.2.5.0040.15**

Glycyrrhizae radices

Собранные в разное время года неочищенные (naturales) или очищенные (mundatae) от пробки корни и подземные побеги многолетних дикорастущих травянистых растений солодки голой – *Glycyrrhiza glabra* L. и солодки уральской –*Glycyrrhiza uralensis* Fisch., сем. бобовых –*Fabaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки.*Цельное сырье.*Куски корней и подземных побегов цилиндрической формы различной длины и толщины. Встречаются куски корней, переходящие в сильно разросшееся корневище более 10 см толщиной.

Поверхность неочищенных корней и побегов продольно-морщинистая, покрытая серовато-коричневой или коричневой пробкой; очищенное сырье снаружи от светло-желтого до коричневато-желтого цвета с незначительными остатками пробки; излом от светло-желтого до желтовато-оранжевого цвета, зернисто-волокнистый.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) на поперечном срезе корней и подземных побегов видны многочисленные широкие сердцевинные лучи и вытянутые группы сосудов, придающие хорошо заметное лучистое строение. Вдоль сердцевинных лучей часто образуются радиальные трещины. У побегов имеется небольшая сердцевина, у корней сердцевины нет. Запах слабый.Вкус водного извлечения сладкий, приторный, слегка раздражающий.

*Измельченное сырье.*Кусочки сырья различной формы, как правило, волокнистые, размером от 1 до 10 мм (для неочищенного сырья) и от 1 до 6 мм (для очищенного сырья) или проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм (для лекарственных растительных препаратов).

Цвет очищенного сырья от светло-желтого до коричневато-желтого с незначительными остатками пробки; неочищенного сырья – желтый, серовато-желтый, коричневато-желтый, с остатками пробки серовато-коричневого или коричневого цвета.Запах слабый, Вкус водного извлечения сладкий, приторный, слегка раздражающий.

*Порошок.*Кусочки сырья различной формы, как правило, волокнистые, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

Цвет очищенного сырья от светло-желтого до коричневато-желтого с незначительными остатками пробки; неочищенного сырья – желтый, серовато-желтый, коричневато-желтый, с остатками пробки серовато-коричневого или коричневого цвета.Запах слабый.Вкус водного извлечения сладкий, приторный, слегка раздражающий.

Микроскопические признаки.*Цельное сырье.*При рассмотрении микропрепаратов поперечного среза у неочищенного корня должна быть видна многослойная пробка, под пробкой – первичная кора, состоящая из крупных вытянутых клеток, нередко с призматическими кристаллами оксалата кальция (у очищенных корней вместе с пробкой частично удалена и первичная кора). Первичная кора переходит в хорошо развитую широкую вторичную кору, в которой видны широкие, к поверхности, иногда расширяющиеся сердцевинные лучи, чередующиеся с лубом, состоящим из ситовидных трубок, лубяных волокон и паренхимных клеток. Ситовидные трубки, кроме узкого слоя, прилегающего к камбию, сдавлены и представляют собой деформированный (облитерированный) луб, образующий удлиненный конус, обращенный широким основанием к камбию, а вытянутая вершина проходит, изгибаясь между группами лубяных

волокон. Лубяные волокна с сильно утолщенными стенками и узкой полостью собраны группами и окружены кристаллоносной обкладкой. Паренхимные клетки коры и сердцевинных лучей содержат зерна крахмала – простые, округлые или яйцевидные. Древесина состоит из сосудов разного диаметра – от узкого до очень широкого, групп склеренхимных волокон с кристаллоносной обкладкой и паренхимы, содержащей крахмал. При окраске раствором йода сердцевинные лучи и паренхима окрашиваются в синий цвет, деформированный луб не окрашивается и остается сероватым, сосуды становятся желтыми, группы волокон коры и древесины оранжевыми. На продольно-радиальном срезе в коре и древесине видны длинные, сильно утолщенные склеренхимные волокна с кристаллоносной обкладкой; в древесине узкие сосуды – сетчатые, средние – со щелевидными порами и широкие – с бочковидными короткими члениками и щелевидными окаймленными порами, расположенными косыми рядами.

Измельченное сырье, порошок. При рассмотрении микропрепаратов должны быть видны фрагменты тонкостенной паренхимы, состоящие из округлых или округло-многоугольных клеток, часто с группами призматических кристаллов оксалата кальция; группы волокон коры и древесины, обычно с кристаллоносной обкладкой; фрагменты луба с ситовидными трубками; фрагменты или группы сетчатых сосудов различного диаметра со щелевидными окаймленными порами, нередко в сопровождении пучков волокон (членики широких сосудов, как правило, короткие, бочковидные); фрагменты пробки, состоящие из нескольких слоев многоугольных клеток.

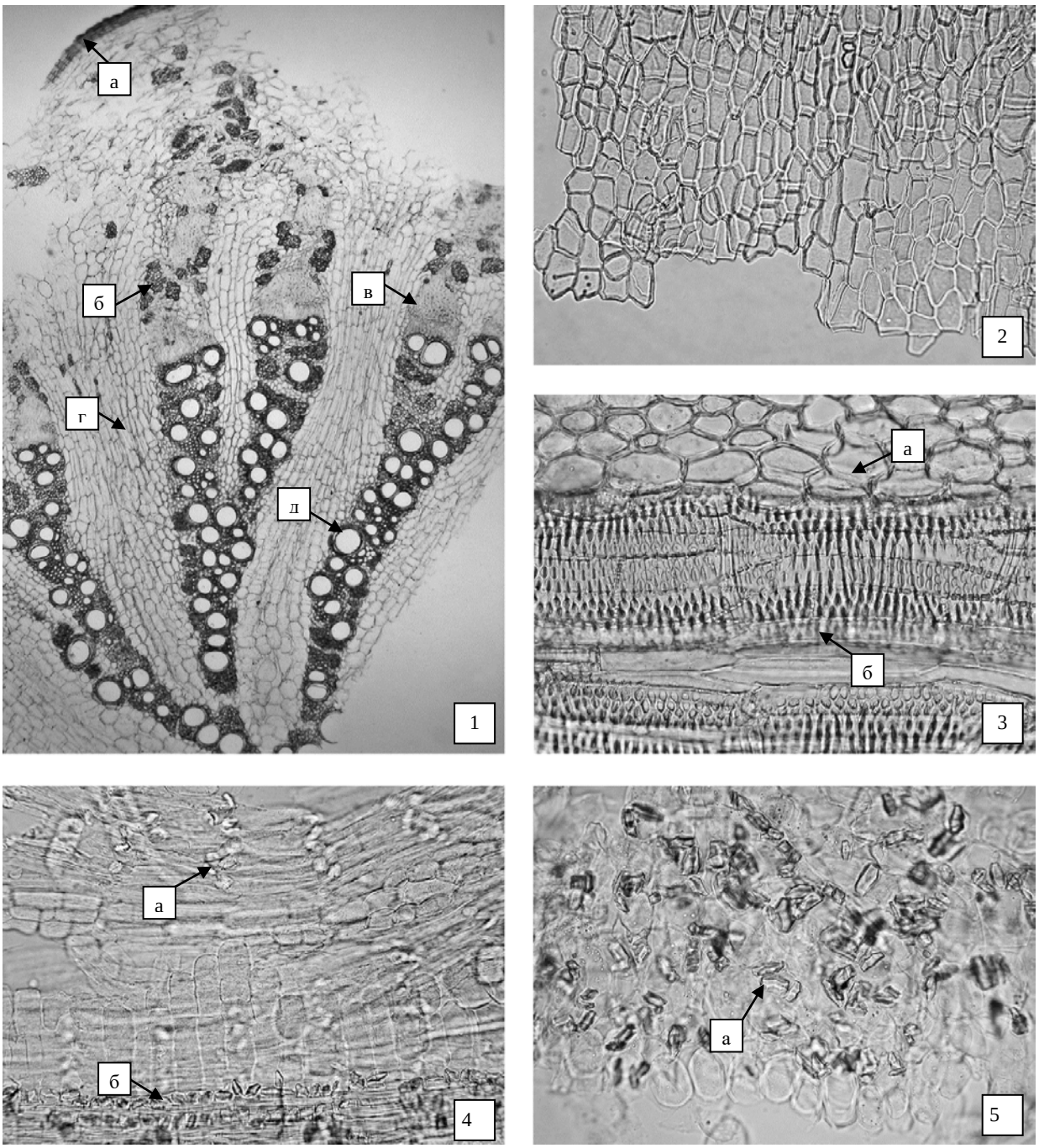


Рисунок – Солодки корни.

1 – фрагмент поперечного среза неочищенного корня: а – пробка, б – лубяные волокна, в – облитерированный луб, г – сосуды ксилемы, д – паренхима сердцевинных лучей (40×); 2 – фрагмент многослойной пробки (200×); 3 – фрагмент продольного среза: а – клетки паренхимы, б – сетчатые сосуды с окаймленными щелевидными порами (400×); 4 – фрагмент корня: а – ситовидные трубки луба, б – волокна с кристаллоносной обкладкой (200×);5 – фрагмент корня: а – паренхимные клетки коры с призматическими кристаллами оксалата кальция (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

*Раствор стандартного образца (СО) 18β-глицирризиновой кислоты.*Около 0,005 г СО моноаммониевой соли глицирризиновой кислоты растворяют в 1 мл смеси спирт 96 %–вода (1:1 о/о) и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор СО кверцетина. Около 0,001 г СО кверцетина растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около0,5 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, приливают 10 мл смеси спирт 96 %–вода (1:1) и кипятят с обратным холодильником на водяной бане в течение 10 мин. После охлаждения до комнатной температуры извлечение фильтруют через бумажный фильтр(испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором наносят 5 мкл испытуемого раствора ипо 5 мкл растворов СО 18β-глицирризиновой кислоты и СО кверцетина. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре, помещают в камеру (без предварительного насыщения) со смесью растворителей бутанол–уксусная кислота ледяная–вода (7:1:2) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, и просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм.

На хроматограмме растворов СО 18β-глицирризиновой кислотыи раствора СО кверцетина должны обнаруживаться темная зона адсорбции (18β-глицирризиновая кислота) и над ней темная зона адсорбции (кверцетин).

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться 2

основные темные зоны адсорбции на уровне зон на хроматограммах раствора СО 18β-глицирризиновой кислоты и раствора СО кверцетина,1 или 2 менее выраженные зоны адсорбции между зонами адсорбции СО; допускается обнаружение других зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье: неочищенное*–не более 14 %;*очищенное*–не более 14 %. *Порошок*– не более 14 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье: неочищенное*– не более 8 %; *очищенное*– не более 8 %. *Порошок*– не более 8 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье: неочищенное* – не более 2,5 %; *очищенное* – не более 1 %.*Измельченное сырье: неочищенное*– не более 2,5 %; *очищенное*– не более 2,5 %. *Порошок*– не более 2,5 %.

Измельченность сырья. *Измельченное сырье (неочищенное и очищенное):*частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 10 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, не более 5 %; частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 6 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, не более 5 %;*Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, не –более 5 %.

Посторонние примеси

Корни, дряблые в изломе, желто-коричневые, и остатки стеблей. *Цельное сырье: неочищенное* – не более 4 %.

Корни, плохо очищенные от пробки. *Цельное сырье: очищенное* – не более 15 %.

Примечание. Плохо очищенными считаются корни с остатками более 3 участков темно-коричневой пробки на одном куске или при поперечнике остатков пробки более 10 мм.

Корни, потемневшие и темно-коричневые на поверхности, но светло-желтые в изломе.*Цельное сырье:очищенное* – не более 20 %.

Частицы корней, потемневшие на поверхности.*Измельченное сырье: очищенное* –не более 15 %.

Частицы, плохо очищенные от пробки.*Измельченное сырье: очищенное* –не более 3 %.

Органическая примесь.*Цельное сырье: неочищенное* – не более 1 %; *очищенное* – не более 0,5 %. *Измельченное сырье: неочищенное*– не более 1 %; *очищенное*– не более 0,5 %.

Минеральная примесь.*Цельное сырье: неочищенное* – не более 1 %; *очищенное* – не более 0,5 %.*Измельченное сырье: неочищенное*– не более 1 %; *очищенное*– не более 0,5 %. *Порошок*– не более 1 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье (неочищенное и очищенное), измельченное сырье(неочищенное и очищенное), порошок:*содержание глицирризиновой кислоты–не менее 6 %

Глицирризиновая кислота

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,2 мм.Около 2,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу вместимостью150 мл, прибавляют 20 мл азотной кислоты ацетонового

раствора 3 % и смесь оставляют на 1 ч при частом и сильном перемешивании. Извлечение фильтруют в цилиндр вместимостью 100 мл и промывают 10 мл ацетона и фильтруют через тот же фильтр. В колбу с сырьем прибавляют еще 20 мл ацетона, которым одновременно смывают сырье с фильтра, и смесь кипятят с обратным холодильником на водяной бане в течение 5 мин. Извлечение фильтруют через тот же фильтр в тот же цилиндр. Экстракцию горячим ацетоном повторяют, таким образом, еще 2 раза, промывают ацетоном до тех пор, пока объем в цилиндре не достигнет 100 мл. Извлечение из цилиндра выливают в стакан вместимостью 200 мл. Цилиндр ополаскивают 40 мл спирта, который затем выливают в тот же стакан. Далее по каплям при интенсивном помешивании добавляют аммиака концентрированный раствор (примерно 0,8-1,0 мл) до появления обильного светло- желтого творожистого осадка (pH 8,3-8,6 устанавливают потенциометрически или по порозовению влажной фенолфталеиновой бумаги). Осадок вместе с маточной жидкостью переносят на фильтр, помещенный в воронку Бюхнера, и жидкость отсасывают. Стакан и фильтр с осадком промывают 50 мл ацетона в 3-4 приема. Осадок с фильтром переносят в стакан, в котором производилось осаждение, и растворяют в 50 мл воды. Полученный раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 250 мл. Фильтр несколько раз промывают небольшими порциями воды и присоединяют их к основному раствору. Доводят объем раствора до метки (раствор А).

3,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора водой до метки (раствор Б).

Оптическую плотность раствора Бизмеряют на спектрофотометре при длине волны 258 нм в кювете с толщиной слоя в 10мм, в качестве раствора сравнения используют воду.

Содержание глицирризиновой кислоты в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 822 \cdot 250 \cdot 50 \cdot 100}{a \cdot 3 \cdot 11000 \cdot 1000} = \frac{A \cdot 3425}{a \cdot 110},$$

где: A – оптическая плотность раствора Б;
a – навеска сырья, г;
822 – молекулярный вес глицирризиновой кислоты;
11000 – молярный показатель поглощения

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Сосны обыкновенной почки **ФС.2.5.0041.15**

Pini silvestris gemmae

Собранные в конце зимы или ранней весной до начала распускания высушенные почки многолетнего вечнозеленого дикорастущего и культивируемого дерева сосны обыкновенной – *Pinus silvestris* L., сем. сосновых – *Pinaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье*. Почки (укороченные верхушечные побеги) одиночные или по нескольку штук в мутовках, окружающих более крупную центральную почку, без стебля или с остатком стебля, длиной не более 3 мм. Почки яйцевидной, яйцевидно-конической или удлиненно-яйцевидной формы, острые, плотно-сомкнутые. Поверхность почек покрыта сухими, спирально расположенными ланцетовидными или треугольными, заостренными по краям бахромчатыми чешуйками, склеенными между собой выступающей смолой. Под чешуями находятся недоразвитые парные зеленые хвоинки – иглы. Интенсивность окраски чешуй уменьшается от наружных к внутренним, а в каждой чешуе – от середины к краям, бахромка по краю бесцветная. На поперечном срезе почки имеют округлую форму.

Цвет почек снаружи розовато-коричневый, красновато-коричневый, на изломе зеленый или коричневый. Длина почек 1 – 4 см. Запах характерный. Вкус водного извлечения горьковатый.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении внутреннего эпидермиса наружной чешуи с поверхности должны быть видны прямоугольные тонкостенные, широкополостные эпидермальные клетки, с

наружной стороны чешуи с сильно утолщенными стенками и узкой полостью, боковые стенки этих клеток пронизаны поровыми канальцами. Краевые клетки наружного эпидермиса в средней части чешуи тонкостенные, с обильными щелевидными порами, бахромка состоит из длинных тонкостенных клеток, напоминающих волоски, которые в месте отхождения от чешуи коленообразно изогнуты. Внешняя стенка эпидермальных клеток очень плотная, полость незначительная и имеет бутылковидную форму. Строение внутренней чешуи сходно со строением наружной чешуи, но при рассматривании с поверхности видно, что у внутренних чешуй боковые стенки клеток пронизаны более частыми поровыми канальцами. В более толстых чешуях находятся смоляные ходы, которые идут от основания чешуйки до ее верхушки.

В поперечном разрезе чешуи должны быть видны вертикально вытянутые клетки наружного эпидермиса, желтоватого цвета, составляющие до 1/3 толщины чешуи в наиболее широкой, средней ее части. Клетки внутреннего эпидермиса в поперечном сечении овальные или прямоугольные, низкие. Мезофилл чешуи спавшийся, в наиболее широкой ее части имеется до 4 рядов клеток, число рядов уменьшается к краям чешуи. Под верхним эпидермисом могут присутствовать клетки с утолщенными стенками.

В поперечном разрезе почки в паренхиме продольно в виде кольца располагаются очень крупные смоляные ходы, выстланные эпителиальными клетками.

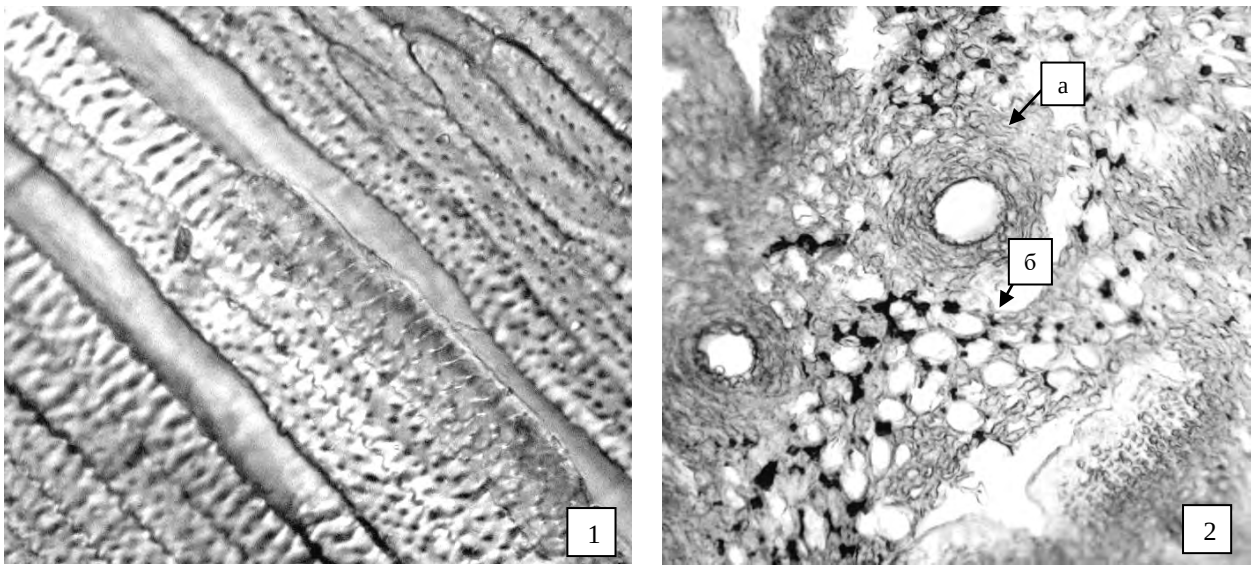


Рисунок – Сосны обыкновенной почки.

1 – эпидермис наружной стороны чешуи (240×); 2 – фрагмент поперечного среза: а – смоляной ход, б – клетки паренхимы (240×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Около 0,1 г сырья, измельченного до отсутствия целых почек, помещают в плоскодонную коническую колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл толуола и перемешивают на механическом шейкере в течение 15 мин. Затем содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки с флуоресцентным индикатором со слоем силикагеля наносят 50 мкл испытуемого раствора. Пластинку с нанесенной пробой сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин смесью растворителей толуол – этилацетат (42,5:2,5), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и просматривают в УФ-свете при 254 нм.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции фиолетового цвета; допускается обнаружение других зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье* – не более 13 %.

Зола общая. *Цельное сырье* – не более 2 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье* – не более 1 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Почки, почерневшие внутри. *Цельное сырье* – не более 10 %.

Почки со стеблем длиной более 3 мм и переросшие. *Цельное сырье* – не более 10 %.

Хвоя. *Цельное сырье* – не более 0,5 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье* – не более 0,5 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье* – не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье:* эфирного масла – не менее 0,3 %.

Определение эфирного масла проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 2, из навески 20,0 г крупноизмельченного (без просеивания) сырья, время перегонки - 2 ч).

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Стальника полевого корни	**ФС.2.5.0094.18**
Ononis arvensis radices	**Взамен ГФ XI ст. 67**

Собранные осенью и высушенные корни дикорастущего и культивируемого многолетнего травянистого растения стальника полевого (пашенного) – *Ononis arvensis* L., сем. бобовых – *Fabaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Цельные или разрезанные корни длиной до 40 см, толщиной 0,5 – 2,5 см. Корни цилиндрические, слегка сплюснутые, перекрученные, прямые или изогнутые, твердые, деревянистые. Поверхность корней продольно-бороздчатая; пробка местами отслаивается; излом волокнистый. Цвет корня с поверхности светло-коричневый, на изломе желтовато-белый. Запах слабый, своеобразный. Вкус водного извлечения сладковато-горьковатый, слегка вяжущий.

Измельченное сырье. Кусочки корней различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм. Цвет светло-коричневый или желтовато-белый. Запах слабый, своеобразный. Вкус водного извлечения сладковато-горьковатый, слегка вяжущий.

Порошок. Кусочки корней различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Цвет светло-коричневый или желтовато-белый. Запах слабый, своеобразный. Вкус водного извлечения сладковато-горьковатый, слегка вяжущий.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.*

На поперечном срезе под микроскопом должно быть видно, что корень стальника вторичного строения непучкового типа, в центре диархный мелкоклеточный луч первичной ксилемы. Корень имеет отчетливо лучистую структуру центрального цилиндра. Проводящие элементы флоэмы и ксилемы расположены узкими радиальными тяжами и разделены широкими многорядными лучами паренхимы.

С поверхности корня расположен узкий пробковый слой, сложенный из смятых клеток с тонкими клеточными стенками, окрашенными в светло-коричневый цвет. При рассмотрении с поверхности клетки пробки многоугольной формы с заметными остатками протопласта.

В коровой части и во флоэме корня на поперечном сечении видны крупные клетки основной паренхимы. Они овальной формы, угловатые, реже смятые, с аморфным протопластом, содержащим мелкие крахмальные зерна (рис. 6). В коровой части корня расположены одиночно или небольшими группам многоугольные лубяные волокна, клеточные стенки которых не одревесневают. Мелкоклеточные проводящие элементы флоэмы расположены ближе к камбию. Зона камбия широкая, четко выраженная.

Ксилема состоит из крупных сосудов и более узких в просвете трахеид, клеток древесной паренхимы и мощных групп волокон либроформа с одревесневшими оболочками. В просвете крупных сосудов изредка встречаются засохшие пигментированные выделения темно-коричневого цвета. К либриформу со стороны сердцевинных лучей паренхимы прилегают клетки с призматическими кристаллами оксалата кальция.

В коровой части корня клетки радиальных лучей паренхимы тангентально вытянуты, в древесинной – вытянутые радиально, с одревесневшими пористыми оболочками. В паренхиме лучей часто встречаются одиночные призматические кристаллы оксалата кальция или их группы, а также содержатся мелкие, простые и 2–4-сложные крахмальные зерна.

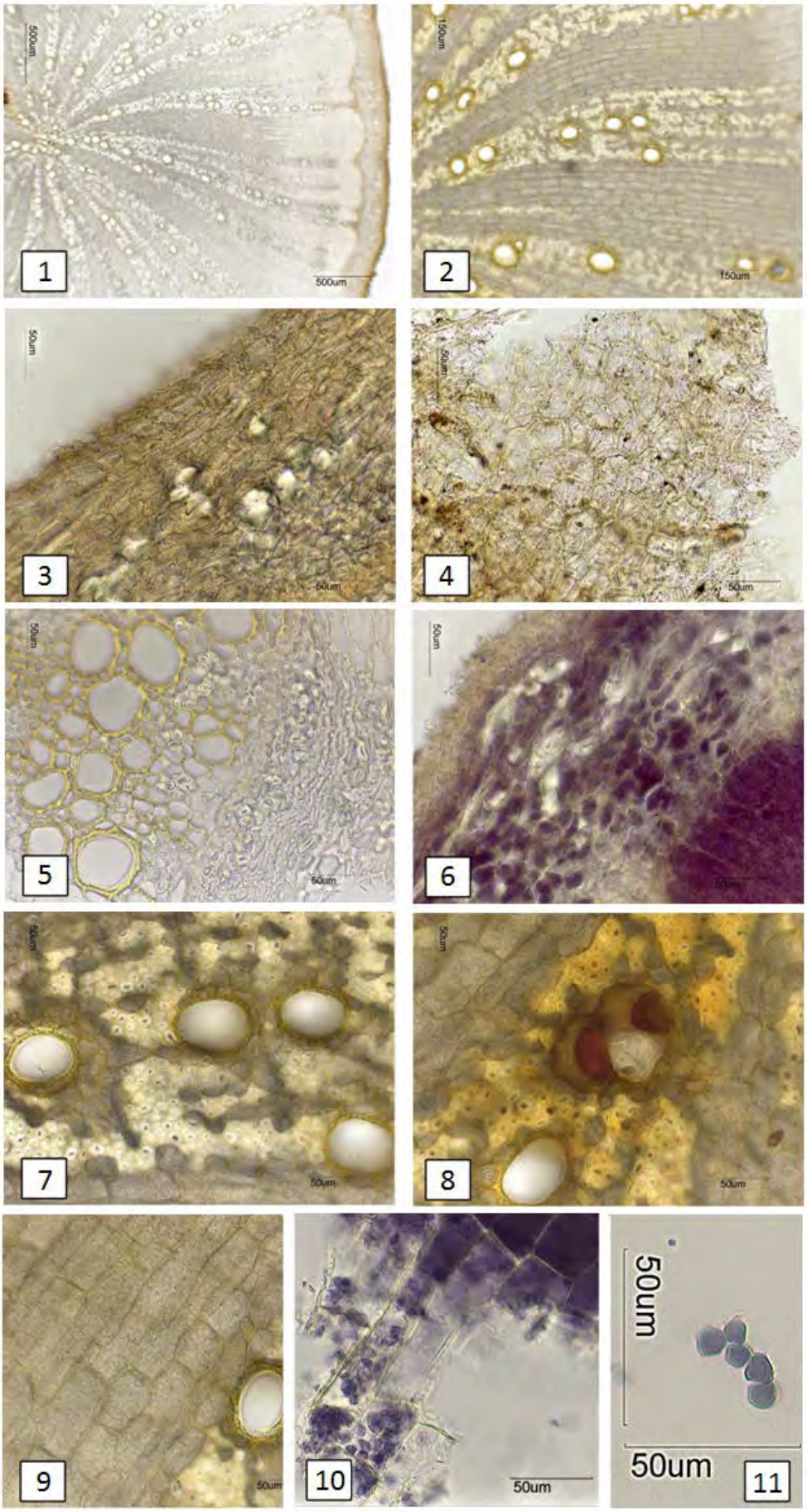


Рисунок 1 – Стальника полевого корни.

1 – поперечный срез корня, вторичное строение с лучистой структурой (40×); 2 – поперечный срез корня, радиальные тяжи ксилемы, разделенные паренхимными лучами (40×); 3 – пробка на поперечном сечении (400×); 4 – пробка с поверхности (400×); 5 – линия камбия и проводящие элементы флоэмы коровой части корня. Окраска раствором сернокислого анилина (400×); 6 – крахмал в протопласте клеток коровой части. Окраска раствором Люголя (400×); 7 – сосуды и волокна либриформа (400×); 8 – пигменты в просвете сосудов (окраска раствором сернокислого анилина) (400×); 9 – радиально вытянутые клетки сердцевинных лучей (400×), 10 – клетки сердцевинных лучей в коровой части (окраска раствором Люголя) (400×), 11 – простые крахмальные зерна (окраска раствором Люголя) (400×).

Измельченное сырье и порошок. При рассмотрении «давленых препаратов» должны быть видны многочисленные фрагменты: ксилемы с волокнами либриформа и кристаллоносной обкладкой; пробки с тонкостенными угловатыми клетками светло-коричневого цвета; паренхимы сердцевинных лучей с мелкими крахмальными зернами.

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 10 мкл (0,01 мл) извлечения (см. раздел «Количественное определение» и рядом 20 мкл (0,02 мл) раствора стандартного образца (СО) ононина (см. раздел «Количественное определение», приготовление раствора А СО ононина). Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в хроматографическую камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 1 ч смесью растворителей: хлороформ - спирт 96 % (2:1) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, пластинку вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и просматривают в УФ - свете при длине волны 254 нм.

На хроматограмме раствора СО ононина должна обнаруживаться зона адсорбции фиолетового цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции фиолетового цвета на уровне зоны адсорбции раствора СО ононина; допускается обнаружение дополнительных слабовыраженных зон адсорбции ниже и выше указанной зоны адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье* – не более 14 %; *измельченное сырье, порошок* – не более 14 %.

Зола общая. *Цельное сырье* – не более 10 %; *измельченное сырье, порошок* – не более 10 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 4 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %. *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм – не более 5 %.

Посторонние примеси

Другие части растения (листья, стебли, в том числе отделенные при анализе). *Цельное сырье* – не более 2 %.

Корней, почерневших в изломе. *Цельное сырье* - не более 1 %;

Органическая примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 1 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок:* сумма изофлавоноидов в пересчете наononин – не менее 1,5 %.

Приготовление растворов.

Раствор СО ононина. Около 0,01 г (точная навеска) СО ононина растворяют в спирте 96 % в мерной колбе вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор А СО ононина).

1 мл раствора А СО ононина переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б СО ононина). Срок годности не более 3 месяцев при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую плоскодонную колбу вместимостью 100 мл с притертой пробкой, прибавляют 50 мл спирта 70 %, закрывают колбу пробкой и взвешивают (с погрешностью ± 0,01 г). Затем колбу соединяют с обратным холодильником и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 90 мин. Затем охлаждают в течение 30 мин, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы.

Извлечение фильтруют через бумажный фильтр. 1 мл фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (испытуемый раствор).

Оптическую плотность испытуемого раствора измеряют на спектрофотометре при длине волны 260 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют спирт 96 %.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО ононина в аналогичных условиях.

Содержание суммы изофлавоноидов в пересчете на ононин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_{\text{о}} \cdot 1 \cdot 50 \cdot 50 \cdot \text{Р} \cdot 100 \cdot 100}{A_{\text{о}} \cdot a \cdot 25 \cdot 25 \cdot 1 \cdot (100 - W) \cdot 100} = \frac{A \cdot a_{\text{о}} \cdot 400 \cdot \text{Р}}{A_{\text{о}} \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;
A_o – оптическая плотность поглощения раствора Б СО ононина;
a – навеска сырья, г;
a_o – навеска СО ононина г;
Р – содержание основного вещества в СО ононина, %;
W – влажность сырья, %.

Допускается вычислять содержание суммы изофлавоноидов в пересчете на ононин и абсолютно сухое сырье с использованием удельного показателя поглощения ононина по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 50 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 250000}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;
$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения ононина при длине волны 260 нм, равный 763;
a – навеска сырья, г;
W – влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование

лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Сушеницы топяной трава
Gnaphalii uliginosi herba

ФС.2.5.0095.18
Взамен ГФ XI, вып. 2, ст. 51

Собранная в начале цветения и высушенная трава с корнями дикорастущего однолетнего травянистого растения сушеницы топяной – *Gnaphalium uliginosum* L. s. l., сем. астровых – *Asteraceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье*. Цельные или частично измельченные олиственные стебли длиной до 30 см с серовато – белым войлочным опушением. Корни тонкие, стержневые, ветвистые. Стебли тонкие, цилиндрические, обычно от основания распростерто – ветвистые. Листья длиной 0,5 – 3,5 см, шириной 0,1 – 0,4 см, очередные, короткочерешковые, линейно – продолговатые, с туповатой верхушкой и выдающейся срединной жилкой. Соцветие состоит обычно из нескольких яйцевидных мелких корзинок длиной 0,3 – 0,4 см, плотно скученных клубочками на верхушках побегов и окруженных лучисторасходящимися листьями, превышающими клубочки соцветий. Обвертка корзинки состоит из 2 – 3 рядов черепитчато-расположенных темно-бурых листочков; наружные листочки яйцевидные, при основании войлочные, в верхней половине голые, блестящие; внутренние – продолговато-яйцевидные, заостренные, голые. Цветки мелкие, желтоватые, трубчатые, пятизубчатые. Плоды – семянки с хохолком из 10 отдельных волосков. Корни стержневые, ветвистые.

Цвет зеленовато-серый. Запах слабый. Вкус водного извлечения солоноватый.

Измельченное сырье. Кусочки стеблей, листьев, соцветий, корней, а также отдельные цветки, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет зеленовато-серый. Запах слабый. Вкус водного извлечения солоноватый.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье, измельченное сырье.* При рассмотрении микропрепаратов листа с поверхности должны быть видны клетки эпидермиса, с обеих сторон более или менее вытянутые по длине листа. Клетки эпидермиса верхней стороны листа должны быть со слабоизвилистыми стенками, с нижней стороны листа – с сильно извилистыми стенками. Клетки в основном прямоугольной формы, у основания и вершины листа вытянутые. Нижний эпидермис с извилистыми и сильноизвилистыми стенками, у основания и вершины листа клетки вытянуты и имеют более ровные стенки. Кутикула ровная. Устьица крупные, овально-округлые, погруженные окружены 4-5 клетками эпидермиса и ориентированы по длине листа (аномоцитный тип) должны встречаться редко; на нижней стороне их значительно больше. На поперечных и продольных срезах должны быть видны утолщенные наружные и внутренние стенки эпидермальных клеток. Открытые коллатеральные сосудисто-волокнистые пучки расположены по кругу с небольшими межпучковыми зонами, в которых межпучковая паренхима склерифицирована. Склеренхимные волокна в виде «шапочек» должны быть расположены над пучками, а также имеются в ксилеме. Сосуды спиральные и точечные должны быть представлены небольшими радиальными тяжами группами по 2-4. Кора должна быть отделена от центрального осевого цилиндра рядом клеток эндодермы. Сердцевина должна быть заполнена крупными паренхимными клетками. Волоски стебля аналогичны волоскам листа.

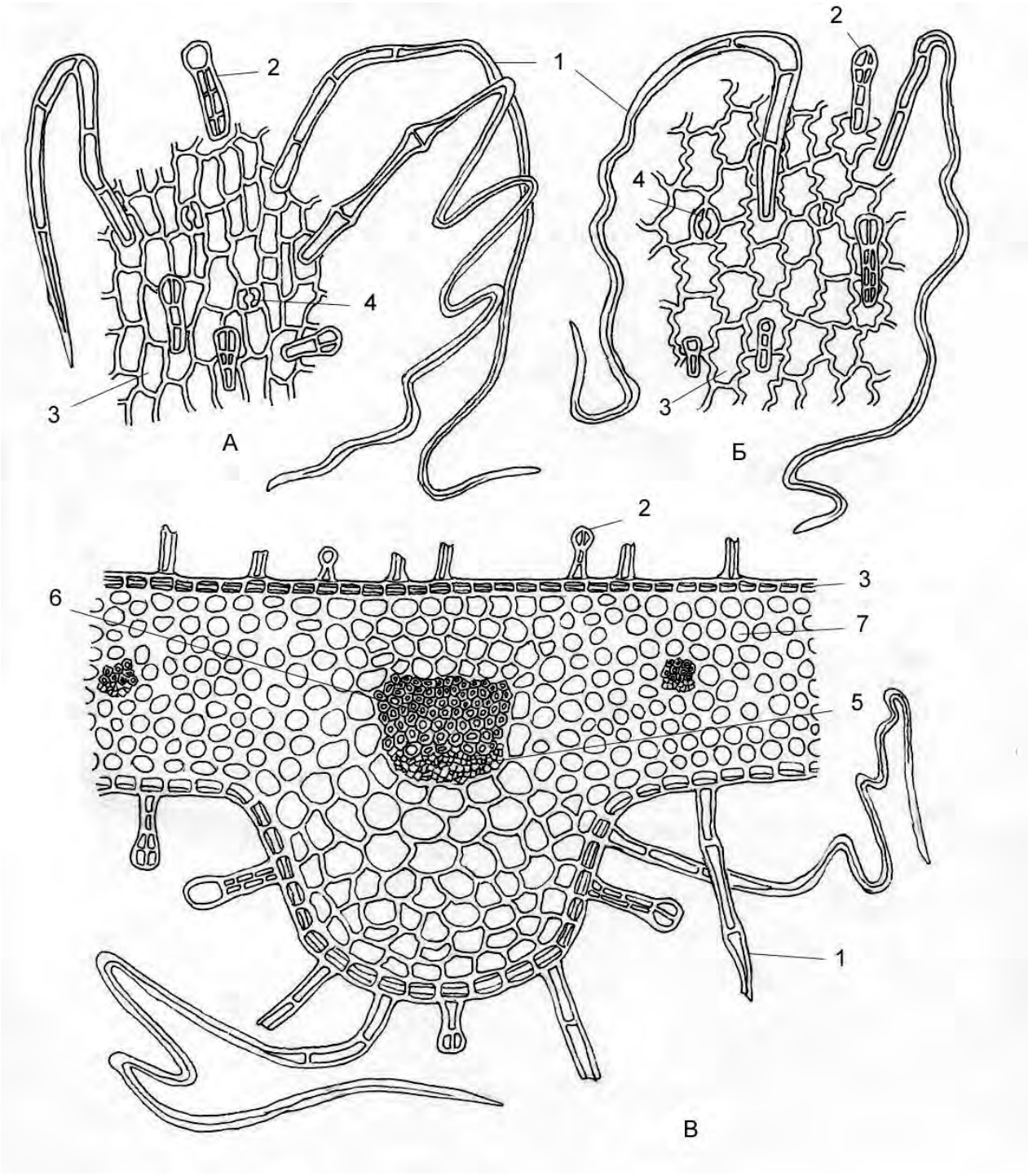


Рисунок 1 – Сушеницы топяной лист:
А – верхний эпидермис (250×). Б – нижний эпидермис (250×). В – поперечный срез (125×). 1 – простые волоски; 2 – головчатые волоски; 3 – клетки эпидермиса; 4 – устьица; 5 – флоэма; 6 – ксилема; 7 – губчатая паренхима.

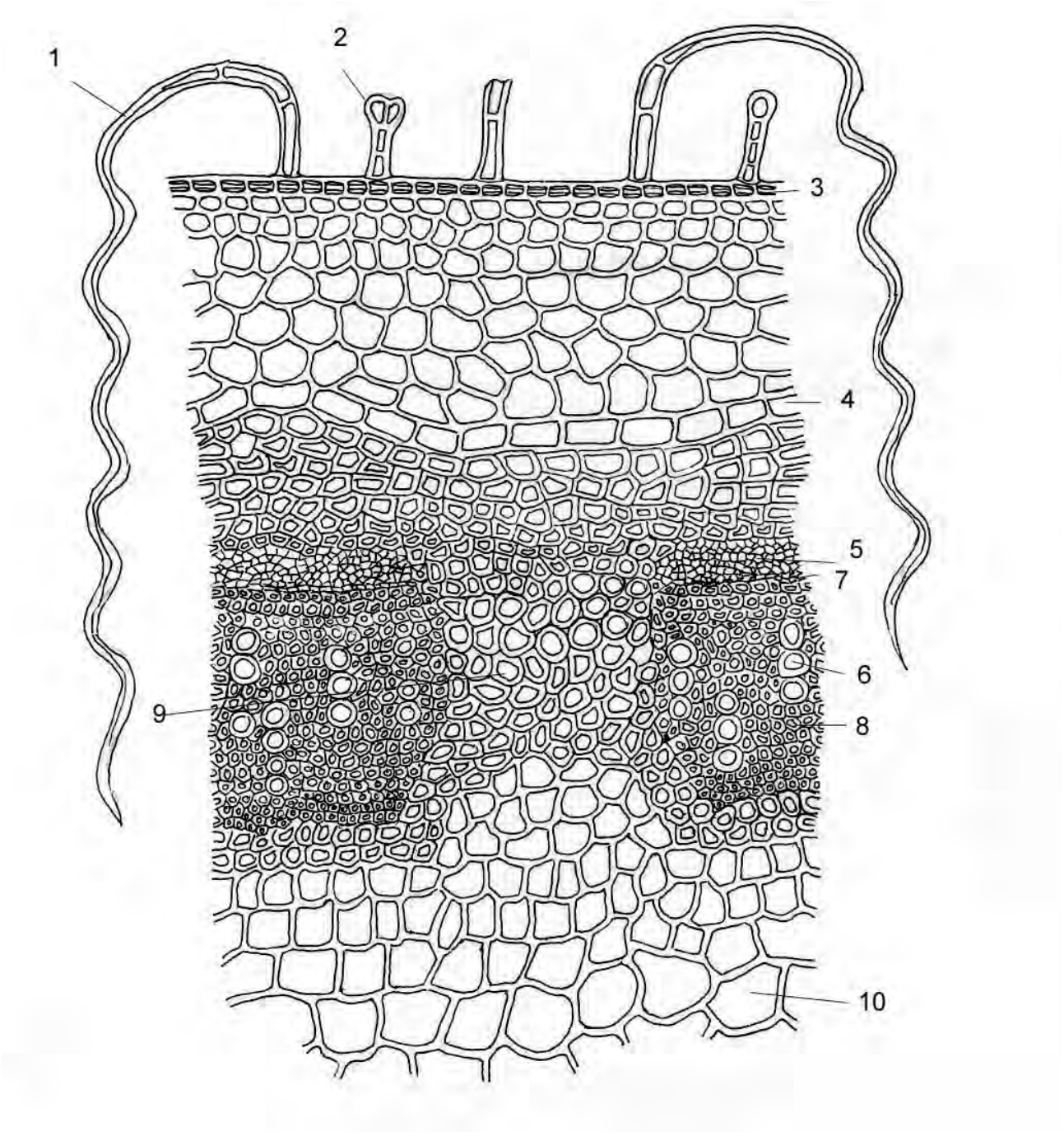


Рисунок 2 – Сушеницы топяной стебель:
поперечный срез (125×). 1 – простые волоски; 2 – головчатые волоски; 3 – клетки эпидермиса; 4 – эндодерма; 5 – флоэма; 6 – сосуды; 7 – камбий; 8 – склеренхимные волокна; 9 – склерифицированная межпучковая паренхима; 10 – паренхима сердцевины.

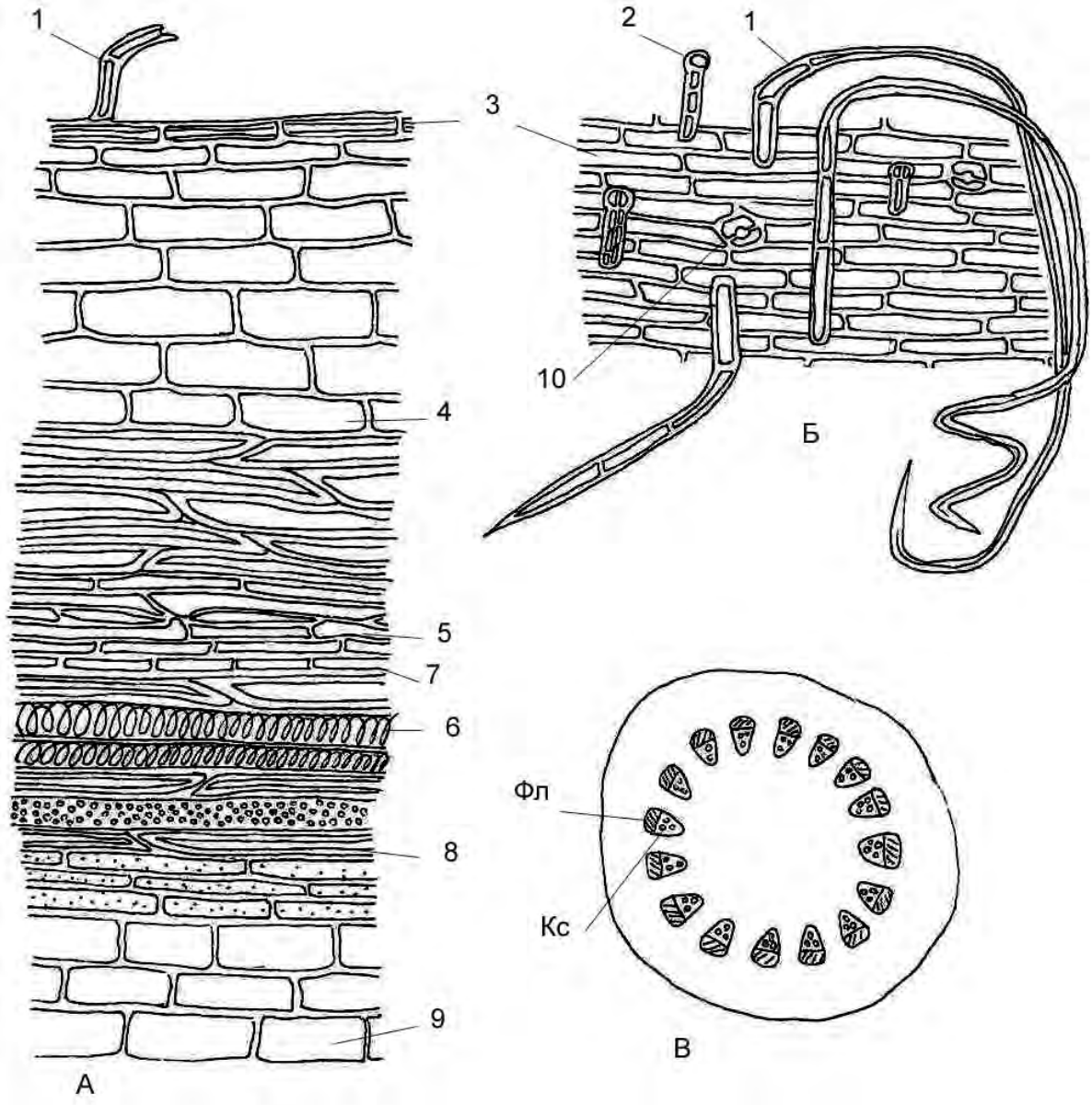


Рисунок 3 – Сушеницы топяной стебель:
А – продольный срез (125×). Б – срез с поверхности (150×). В – схема расположения сосудисто-волокнистых пучков на поперечном срезе. 1 – простые волоски; 2 – головчатые волоски; 3 – клетки эпидермиса; 4 – эндодерма; 5 – флоэма; 6 – сосуды; 7 – камбий; 8 – склеренхимные волокна; 9 – паренхима сердцевины; 10 – устьица; Фл – флоэма; Кс – ксилема.

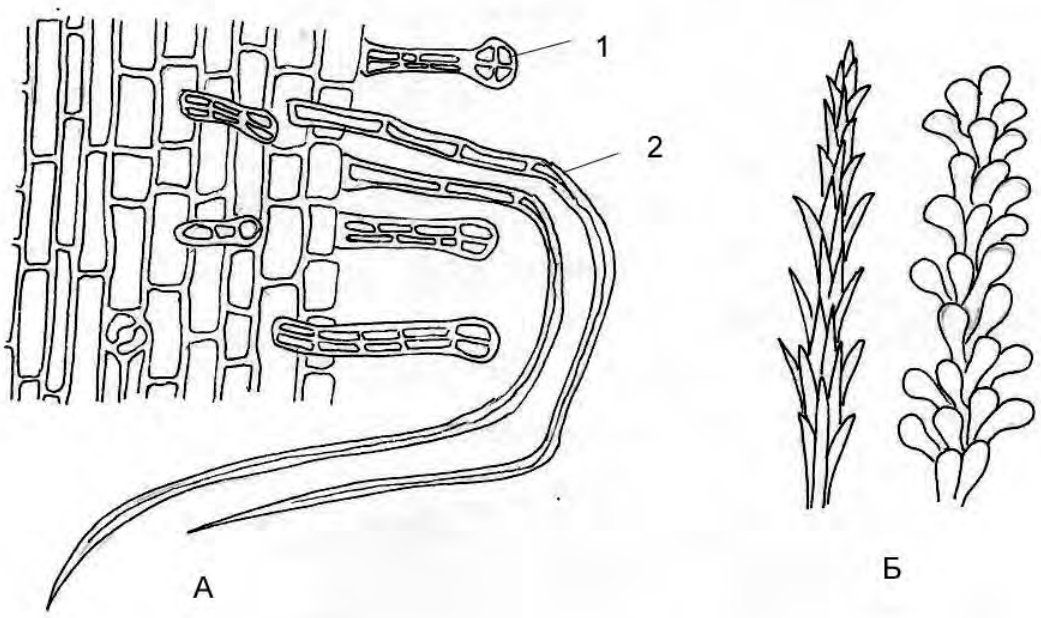


Рисунок 4 – Сушеницы топяной цветки:
А – эпидермис обвертки корзинки. Б – волоски летучки семянки. 1 – головчатые волоски. 2 – простые волоски.

Эпидермис обвертки корзинки должен состоять из вытянутых прямоугольных клеток с ровными стенками и редко встречающихся аномоцитных устьиц. Кутикула ровная. Волоски должны быть такими же, как волоски листа, но головчатые волоски более крупные, насчитывающие до четырех клеток в высоту. Хохолок семени должен состоять из многочисленных пучковых многоклеточных волосков. Пыльца округлая шиповатая трехпоровая.

Определение основных групп биологически активных веществ.

Тонкослойная хроматография.

Около 5,0 г (точная навеска) измельченного до однородной массы сырья, помещают в круглодонную колбу 250 мл, прибавляют 60 мл спирта 70 % и нагревают на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 45 мин. Колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры и фильтруют в мерную колбу вместимостью 100 мл через бумажный фильтр. В

колбу со шротом добавляют 40 мл спирта 70 %, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане в течение 15 мин. Колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры и фильтруют через тот же фильтр в ту же мерную колбу. Объем раствора доводят спиртом 70 % до метки и тщательно перемешивают (раствор А).

20 мл раствора А упаривают до удаления запаха спирта на кипящей водяной бане. Водный остаток раствора А разбавляют водой очищенной до 30 мл и переносят в делительную воронку 100 мл. В ту же воронку добавляют 20 мл бутанола и встряхивают в течение 10 мин. Бутанольное извлечение переносят в колбу и упаривают на водяной бане под вакуумом досуха. Сухой остаток растворяют в 5 мл спирта 70 % (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 20 мкл (0,02 мл) испытуемого раствора. Пластинку с нанесенной пробой сушат на воздухе в течение 10 мин, помещают в камеру со смесью растворителей: бутанол - уксусная кислота - вода (9:1:0,5) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителя пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат на воздухе до удаления следов растворителей в течение 15 мин. Затем пластину обрабатывают алюминия хлорида спиртовым раствором 5 %, выдерживают при температуре 100 - 105 °С в сушильном шкафу в течение 10 мин и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме испытуемого раствора в верхней трети должны обнаруживаться две зоны адсорбции с флуоресценцией зеленого цвета (флавоноиды); допускается обнаружение дополнительных зон адсорбции ниже указанных зон адсорбции.

УФ-спектрофотометрия

В УФ-спектре испытуемого раствора, полученного при количественном определении, в области от 200 до 400 нм, должны регистрироваться максимумы поглощения при (216 ± 3) нм и (330 ± 3) нм и минимум поглощения при (266 ± 3) нм.

Качественная реакция

Около 1,0 г сырья помещают в колбу вместимостью 25 мл и прибавляют 10 мл спирта 96 %, соединяют с обратным холодильником и нагревают на водяной бане в течение 10 мин с момента закипания спирта в колбе. После охлаждения до комнатной температуры полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр.

В две одинаковые пробирки помещают по 2 мл полученного фильтрата, затем в одну из пробирок добавляют 0,5 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 % (испытуемый раствор), а во вторую – 0,5 мл спирта 96 % (раствор сравнения), содержимое пробирок перемешивают. Через 20 мин в обе пробирки прибавляют по 10 мл воды очищенной, перемешивают содержимое и просматривают на белом фоне. Анализируемый раствор должен иметь желтый цвет и по интенсивности окраски заметно превосходить раствор сравнения (флавоноиды).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье* - не более 13 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье* - не более 20 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье* - не более 10 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье.* Измельченных частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье.* Частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, - не более 10 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,31 мм, - не более 10 %.

Посторонние примеси

Органической примеси. *Цельное сырье, измельченное сырье* - не более 2 %.

Минеральной примеси. *Цельное сырье, измельченное сырье* - не более 2 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье.* Сумма флавоноидов в пересчете на гнафалозид А – не менее 0,2 %

Приготовление растворов

Приготовление колонки: 1,5 г порошка полиамида для колоночной хроматографии помещают в стакан вместимостью 50 мл, заливают 30 мл воды, перемешивают и выливают через воронку диаметром 3,5 см в колонку шириной 1,2 см и высотой 25 см, в нижнюю часть которой помещают небольшой ватный тампон, предварительно смоченный водой. Колонку заполняют при открытом кране. Элюирование проводят со скоростью 4 мл/мин.

Контрольный раствор. Контрольный раствор получают аналогично определяемой сумме флавоноидов путем пропускания 50 мл спирта 96 % через колонку в мерную колбу вместимостью 50 мл. Объем раствора доводят спиртом 96 % до метки и перемешивают.

Стандартный раствор калия бихромата. Около 0,03 г (точная навеска) калия бихромата, высушенного до постоянной массы, растворяют в серной кислоте растворе 0,005 М в мерной колбе вместимостью 1 л, доводят объем раствора тем же раствором до метки и перемешивают.

Серной кислоты раствор 0,005 М. К 1 л воды приливают 0,28 мл серной кислоты концентрированной и перемешивают.

Аналитическую пробу сырья измельчают до получения однородной массы. Около 5,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в патрон из фильтровальной бумаги и экстрагируют спиртом 96 % в аппарате Сокслета с экстрактором вместимостью 150 мл на кипящей водяной бане в течение 5 ч (20 ÷ 25 сливов). Извлечение в круглодонной колбе вместимостью 100 мл упаривают по частям на кипящей водяной бане досуха.

К сухому остатку в колбе прибавляют 5 мл натрия хлорида раствора 10 %, нагревают на кипящей водяной бане в течение 2 мин, растирая осадок стеклянной палочкой до растворения. После охлаждения раствор количественно переносят на колонку с полиамидным сорбентом. Операцию проводят два раза. Слив производят через воронку с ватным тампоном, предварительно смоченным водой.

Колонку промывают 10 мл воды, затем убирают ватный тампон и промывают колонку еще 20 мл воды. Водный элюат отбрасывают. Флавоноиды элюируют 50 мл спирта 96 % со скоростью 4 мл/мин. Когда темно-желтая зона (в УФ-свете) подойдет к нижней части сорбента, элюат собирают в мерную колбу вместимостью 50 мл. Объем извлечения доводят спиртом 96 % до метки и тщательно перемешивают.

1 мл полученного элюата переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, объем доводят раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (испытуемый раствор). Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 338 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм по сравнению с контрольным раствором.

Параллельно измеряют оптическую плотность стандартного раствора калия бихромата. В качестве раствора сравнения используют серной кислоты раствор 0,005 М.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на гнафалозид А в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 0{,}2020 \cdot 50 \cdot 50 \cdot 1{,}03 \cdot a_0 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 1 \cdot 1000 \cdot (100-W)} = \frac{A \cdot 5{,}201 \cdot a_0}{A_0 \cdot a \cdot (100-W)},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность стандартного раствора калия бихромата;

a_0 – навеска калия бихромата, г;

a – навеска сырья, г;

0,2020 – коэффициент пересчета калия бихромата на гнафалозид А;

1,03 – поправочный коэффициент на неполное элюирование гнафалозида А с полиамидного сорбента;

W – влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Термопсиса ланцетного трава **ФС.2.5.0096.18**

Thermopsidis lanceolatae herba **Взамен ГФ XI, вып. 2, ст. 59**

Собранная в начале цветения до появления плодов и высушенная трава дикорастущего многолетнего травянистого растения термопсиса ланцетного – *Thermopsis lanceolata R. Br*., сем. бобовых – *Fabaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Цельные или частично измельченные стебли с листьями и цветками. Стебли простые или ветвистые, бороздчатые, слабоопушенные, длиной до 30 см. Листья очередные, тройчатые на коротких черешках (4 - 7 мм), с продолговатыми или продолговато - ланцетными листочками длиной 30 - 60 мм, шириной 5 - 12 мм. Сверху почти голые, снизу покрытые прижатыми волосками. Прилистники ланцетные, почти вдвое короче листочка, опушены прижатыми волосками. Цветки собраны мутовками в негустую верхушечную кисть. Чашечка колокольчатая, пятизубчатая с неравными по длине зубцами, опушена прижатыми волосками. Венчик мотыльковый, желтый, длиной 25 - 28 мм, верхний лепесток (флаг) с почти округлым отгибом, на верхушке с глубоким и узким вырезом; два боковых лепестка (крылья) лишь немного короче флага; нижние сросшиеся лепестки (лодочка) в 1,5 - 2 раза шире крыльев. Тычинок 10, все свободные; пестик 1 с тонким изогнутым столбиком и верхней одногнездной шелковисто-опушенной завязью. Цвет стеблей и листьев серовато-зеленый.

Запах слабый, своеобразный.

Вкус водного извлечения не определяют (сырье ядовито).

Измельченное сырье. Кусочки стеблей, листьев и цветков различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет кусочков стеблей и листьев серовато – зеленый, цветков – желтый.

Запах слабый, своеобразный.

Вкус водного извлечения не определяют (сырье ядовито).

Порошок. Кусочки стеблей, листьев и цветков различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 0,16 мм. Цвет серовато-зеленый с желтыми вкраплениями.

Запах слабый, своеобразный.

Вкус водного извлечения не определяют (сырье ядовито).

Микроскопия. *Цельное сырье.* При рассмотрении микропрепаратов листа с поверхности должны быть видны многоугольные клетки верхнего эпидермиса со слабоизвилистыми стенками, нижнего – с более извилистыми. Местами, особенно на верхнем эпидермисе, стенки клеток должны иметь четковидные утолщения. Устьица овальные, должны быть окружены 3-5 побочными клетками (аномоцитный тип), погруженные, преобладают на нижней стороне листа. Волоски многочисленные, двухклеточные и состоят из короткой базальной клетки и длинной терминальной, прижатой к поверхности листа. У одних волосков терминальная клетка длинная, с толстой, снаружи крупнобугристой поверхностью и узкой полостью, у других она несколько короче, с тонкой оболочкой и гладкой поверхностью. Клетки эпидермиса у основания волосков должны образовывать многолучевую розетку. При отрыве волоска в центре розетки должен быть виден круглый валик. При рассмотрении микропрепарата чашечки должны быть видны многочисленные двухклеточные волоски с короткой базальной клеткой.

В клетках эпидермиса листа, стебля, чашелистиков чашечки должны быть видны многочисленные сферокристаллы фенологликозида термопсиланцина, легко растворимые в щелочи. Они желтовато-бурого цвета разнообразной формы – от круглой, овальной, почкообразной до веерообразной и разветвленной.

При рассмотрении микропрепарата лепестков с поверхности должны быть видны извилистостенные клетки эпидермиса, трехбороздные пыльцевые зерна. Клетки эпидермиса стебля прозенхимные, вытянутые по длине с редкими волосками.

Измельченное сырье. При рассмотрении микропрепаратов листа с поверхности должны быть видны фрагменты клеток эпидермиса с устьицами, розетками, со сферокристаллами, многочисленные волоски, обрывки сосудов.

Порошок. При рассмотрении микропрепаратов порошка должны быть видны фрагменты эпидермиса с устьицами, розетками и иногда сферокристаллами, многочисленные обрывки волосков, паренхимы и сосудов.

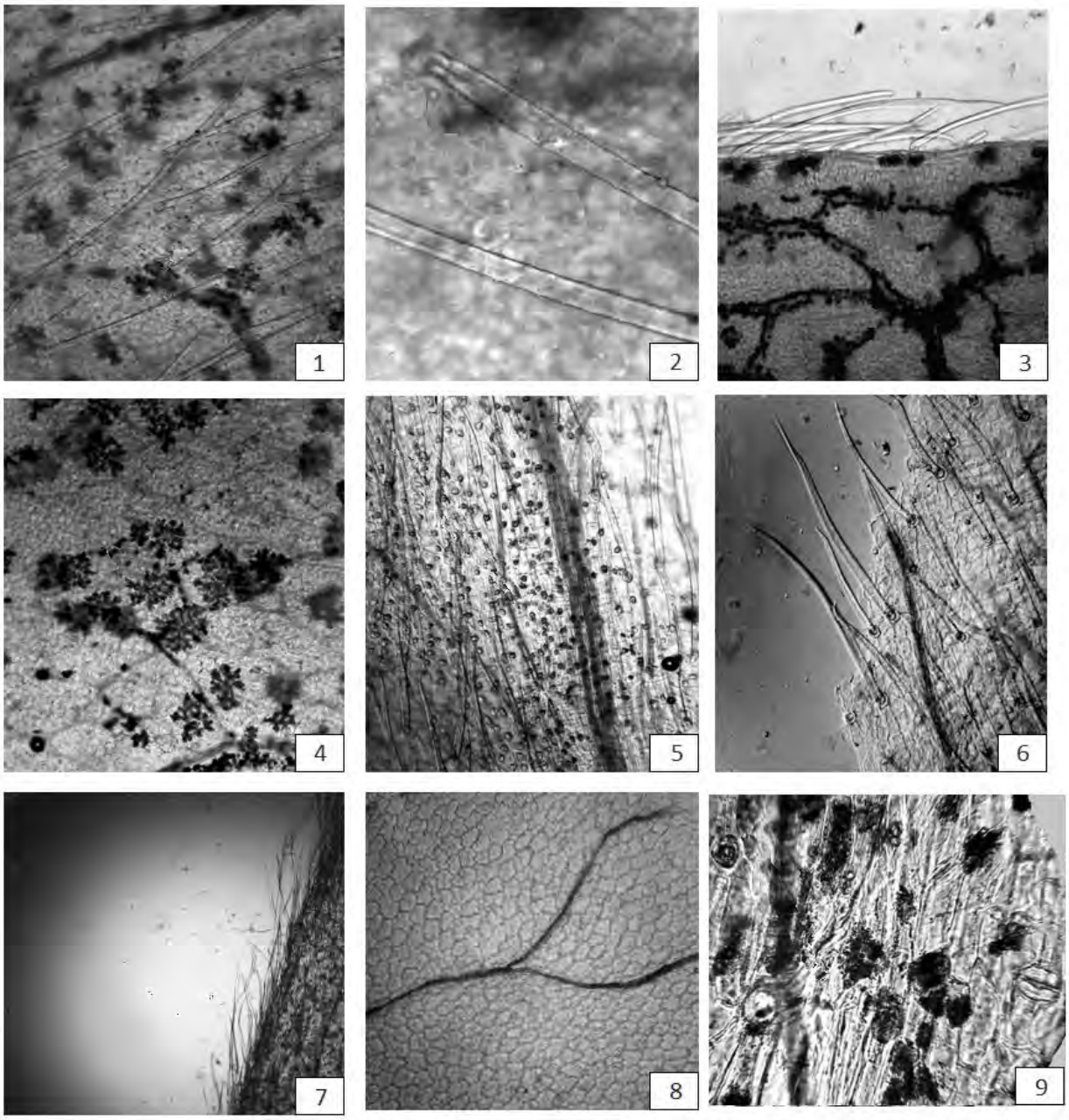


Рисунок – Термопсиса ланцентного трава

1 – волоски листа с крупнобугристой и гладкой поверхностью и сферокристаллы (400×); 2 – фрагмент волоска листа с крупнобугристой поверхностью (1000×); 3 – волоски по краю листа (400×); 4 – сферокристаллы фенологликозида термопсиланцина в эпидермисе листа (400×); 5 – волоски чашечки, пыльцевые зерна трехбороздные (400×); 6 – волоски чашечки (400×); 7 – волоски по краю чашечки (100×); 8 – извилистостенный эпидермис венчика (1000×); 9 – эпидермис стебля, прозенхимные клетки, устьица, сферокристаллы (1000×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором наносят полосой 30 мкл (0,03 мл) раствора А, приготовленного для количественного определения. Пластинку с нанесенной пробой сушат на воздухе в течение 5 мин, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 1 ч смесью растворителей: хлороформ – ацетон – этанол – аммиак 25 % (20:20:3:1) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителя пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, обрабатывают реактивом Драгендорфа и рассматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора А должны обнаруживаться не менее 3 зон адсорбции оранжевого цвета.

Качественная реакция

1,0 г сырья измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, экстрагируют на кипящей водяной бане 10 мл хлористоводородной кислоты 1 % в течение 5 мин, охлаждают и фильтруют.

0,5 мл фильтрата помещают в пробирку, прибавляют 0,5 мл реактива Драгендорфа; должно наблюдаться образование осадка оранжевого цвета (алкалоиды).

ИСПЫТАНИЕ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 13 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 8 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 4 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, не более 5 %. *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,16 мм, не более 5 %.

Посторонние примеси

Плоды. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1 %.

Побуревших частей травы и корней (в том числе отделенных при анализе). *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 4 %;

Органической примеси. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 2%.

Минеральной примеси. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 1%.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок:* сумма алкалоидов в пересчете на термопсин – не менее 1,5 %.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 10,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл хлороформа и 5 мл аммиака раствора 25 %, закрывают пробкой и встряхивают на вибрационном встряхивателе в течение 2 ч или оставляют

при комнатной температуре на 15 ч, после чего встряхивают еще в течение 30 мин. Органическое извлечение фильтруют через вату (раствор А).

50,0 мл раствора А переносят в колбу вместимостью 100 мл и хлороформ отгоняют до объема 1 - 2 мл. Оставшийся хлороформ удаляют продуванием воздуха. К остатку прибавляют 2 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида и растирают стеклянной палочкой до полного исчезновения комочков, затем прибавляют пипеткой 8 мл воды и перемешивают в течение 2 - 3 мин. К содержимому прибавляют пипеткой 10 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты, осторожно перемешивают и оставляют на 8 - 10 мин, затем встряхивают на вибрационном встряхивателе в течение 8 - 10 мин и фильтруют через тройной бумажный складчатый фильтр диаметром 7 см (раствор Б).

10,0 мл раствора Б переносят в колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 10 мл воды, 2 капли метилового красного раствора и титруют избыток кислоты 0,1 М раствором натрия гидроксида до появления желтого окрашивания.

Параллельно проводят контрольный опыт. В колбу вместимостью 50 мл помещают 1 мл 0,1 М раствором натрия гидроксида, прибавляют 4 мл воды и 5 мл 0,2 М раствора хлористоводородной кислоты, перемешивают, прибавляют 2 капли метилового красного раствора и титруют избыток кислоты 0,1 М раствором натрия гидроксида до появления желтого окрашивания.

Содержание суммы алкалоидов в пересчете на термопсин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(Vo - V) \cdot 0{,}0244 \cdot 100 \cdot 20 \cdot 100 \cdot 100}{50 \cdot 10 \cdot a \cdot (100 - W)} = \frac{(V_1 - V_2) \cdot 976}{a \cdot (100 - W)}$$

где: 0,0244 – количество алкалоидов в пересчете на термопсин, соответствующее 1 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты, г;

V_o – объем 0,1 М раствором натрия гидроксида, пошедшего на титрование контрольного опыта, г;

V – объем 0,1 М раствором натрия гидроксида, пошедшего на титрование испытуемого раствора, мл;
a – навеска сырья, г;
W – влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Тимьяна обыкновенного трава	**ФС.2.5.0097.18**
Thymi vulgaris herba	**ГФ XI, вып. 2 ст. 61**

Собранная в фазу цветения, высушенная и обмолоченная трава культивируемого полукустарника тимьяна обыкновенного – *Thymus vulgaris* L., сем. яснотковых – *Lamiaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Смесь цельных или частично измельченных листьев, цветков и кусочков стеблей толщиной до 1 мм. Листья мелкие, короткочерешковые, цельнокрайние, продолговато - обратнояйцевидной или продолговато - ланцетовидной формы с завернутым вниз краем; длина 5 – 10 мм, ширина 2 – 5 мм. Под лупой (10×) на обеих поверхностях листа видны многочисленные круглые, блестящие, красновато - коричневые железки с эфирным маслом.

Цветки мелкие, одиночные или по нескольку вместе. Чашечка двугубая, пятизубчатая, венчик двугубый. Кусочки стеблей различной длины, толщиной до 1 мм, слегка четырехгранные.

Цвет листьев сверху темно - зеленый или коричневато - зеленый, снизу – серовато - зеленый; чашечки – светло - зеленый, иногда у основания верхней губы фиолетовый; венчика – розовый, светло - лиловый или беловатый, стеблей – от зеленовато - коричневого до коричневого с сероватым оттенком. Запах сильный характерный. Вкус водного извлечения горьковато - пряный, слегка жгучий.

Измельченное сырье. Смесь кусочков листьев, цветков и стеблей, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки стеблей слегка четырехгранные, тонкие от зеленовато - коричневого цвета до коричневого с сероватым оттенком. Листья сверху темно - зеленого или коричневато - зеленого цвета, снизу серовато - зеленого, цельные с завернутым вниз краем и в виде кусочков различной формы; на обеих поверхностях листа видны многочисленные круглые, блестящие, красновато - коричневые железки с эфирным маслом. Цветки мелкие, одиночные или по нескольку вместе с двугубым венчиком розоватого, светло - лилового или беловатого цвета и двугубой светло - зеленой, иногда у основания верхней губы фиолетовой чашечкой, часто измельчены.

Цвет измельченного сырья зеленый, серовато-зеленый с зеленовато-фиолетовыми, розовато - коричневыми, светло - лиловыми или беловатыми вкраплениями. Запах сильный характерный. Вкус водного извлечения горьковато - пряный, слегка жгучий.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье, измельченное сырье.* При рассмотрении микропрепарата листа с поверхности должны быть видны клетки эпидермиса верхней и нижней сторон листа с извилистыми стенками; на верхнем эпидермисе иногда заметна складчатость кутикулы и четковидное утолщение стенок. Устьица имеются на обеих поверхностях листа и сопровождаются двумя околоустьичными клетками, расположенными перпендикулярно устьичной щели (диацитный тип). Эфиромасличные железки круглые, состоят из 8 выделительных клеток, расположенных радиально. Волоски нескольких типов: очень крупные, многоклеточные, бородавчатые волоски, расположенные у основания листа (выше по краю листа встречаются более мелкие волоски); головчатые волоски с овальной одноклеточной головкой на короткой одноклеточной ножке; сосочковидные выросты эпидермиса, гладкие или слегка бородавчатые, чаще встречаются на верхней стороне листа и по краю.

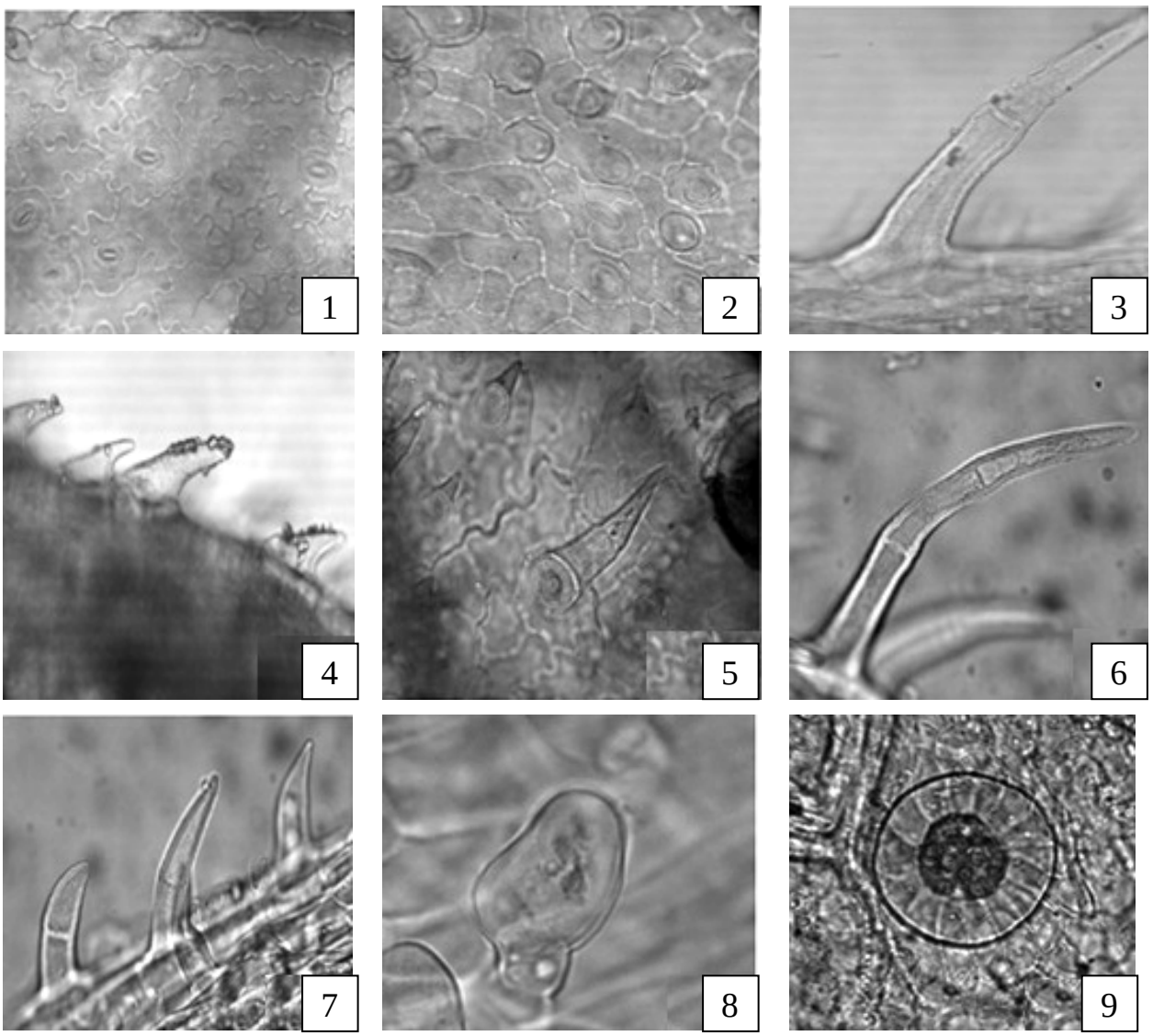


Рисунок – Тимьяна обыкновенного трава
1 – фрагмент нижнего эпидермиса листа: извилистые стенки, устьица диацитного типа; 2 – фрагмент верхнего эпидермиса листа: слабоизвилистые стенки, устьица диацитного типа, складчатость кутикулы; 3 – фрагмент края листа с простыми двухклеточными бородавчатыми изогнутыми волосками, 4 – фрагмент листа с простыми одноклеточными бородавчатыми изогнутыми волосками; 5 – фрагмент эпидермиса поверхности листа: волоски простые одно – и двухклеточные прямые, бородавчатые; 6 – изогнутые волоски на эпидермисе стебля: простой трехклеточный волосок с бородавчатой поверхностью; 7 – простой двухклеточный волосок с бородавчатой поверхностью; 8 – головчатый волосок с одноклеточной головкой на одноклеточной ножке; 9 – фрагмент чашечки: эфирномасличная железка.

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов

Раствор стандартного образца (СО) рутина. Около 0,005 г СО рутина растворяют в 10 мл спирта 70 % и перемешивают. Срок годности раствора 1 мес при хранении в прохладном, защищенном месте.

Раствор стандартного образца (СО) лютеолин-7-гликозида. Около 0,01 г СО лютеолин-7-гликозида растворяют в 10 мл спирта 70 % и перемешивают. Срок годности раствора 1 мес при хранении в прохладном, защищенном месте.

Раствор стандартных образцов (СО) тимола и карвакрола. Около 5 мг СО тимола и 10 мкл СО карвакрола растворяют в 10 мл метиленхлорида и перемешивают. Срок годности раствора 1 мес при хранении в прохладном, защищенном месте.

К 1,0 г измельченного сырья прибавляют 5 мл метиленхлорида, встряхивают в течение 3 мин и фильтруют через бумажный фильтр, содержащий 2 г натрия сульфата безводного (испытуемый раствор).

На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флюоресцентным индикатором наносят в виде полос длиной 10 мм и шириной не более 2 мм 20 мкл (0,02 мл) испытуемого раствора и 20 мкл (0,02 мл) раствора СО тимола и карвакрола. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную метиленхлоридом в течение 1 ч, и хроматографируют восходящим методом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителя, просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм.

На хроматограмме раствора СО тимола и карвакрола в средней трети пластинки должна обнаруживаться зона адсорбции СО тимола фиолетового цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции на уровне зоны адсорбции СО тимола, зона адсорбции фиолетового цвета ниже зоны адсорбции СО тимола и одна зона адсорбции фиолетового цвета выше зоны адсорбции СО тимола.

Затем пластинку опрыскивают анисового альдегида раствором спиртовым сернокислым (2) и выдерживают при температуре 100 – 105 °С в течение 10 мин и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО тимола и карвакрола должны обнаруживаться зона адсорбции СО карвакрола бледно-фиолетового цвета в средней трети пластинки и выше зона адсорбции СО тимола коричнево-розового цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться зоны адсорбции (в порядке возрастания): фиолетового цвета, сиреневато-фиолетового цвета, серовато-коричневого цвета, фиолетового цвета, серовато-розового цвета; зона адсорбции бледно-фиолетового цвета на уровне зоны адсорбции СО карвакрола и зона адсорбции коричневато-розового цвета на уровне зоны адсорбции СО тимола; допускается обнаружение других зон адсорбции (терпеноиды).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят в виде полос длиной 10 мм и шириной не более 2 мм 20 мкл (0,02 мл) испытуемого раствора, приготовленного для количественного определения суммы флавоноидов, 10 мкл (0,01 мл) раствора СО лютеолин-7-гликозида и 10 мкл (0,01 мл) раствора СО рутина. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 3 ч смесью растворителей бензол – уксусная кислота – вода (4:1:2), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 - 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, опрыскивают алюминия хлорида спиртовым раствором 2 % и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО лютеолин-7-гликозида в верхней трети пластинки должна обнаруживаться зона адсорбции с флюоресценцией желтого цвета.

На хроматограмме раствора СО рутина в средней трети пластинки должна обнаруживаться зона адсорбции с флюоресценцией желтого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться две

зоны адсорбции с флюоресценцией желтого цвета на уровне зон адсорбции СО рутина и СО лютеолин-7-гликозида, зона адсорбции с флюоресценцией желтого цвета ниже зоны адсорбции СО рутина и зона адсорбции с флюоресценцией голубого цвета выше зоны адсорбции СО лютеолин-7-гликозида; допускается обнаружение других зон адсорбции (флавоноиды).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 13 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 12 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 4,5 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Стеблей, толщиной более 1 мм – не более 5 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 2 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 2 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном

растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье:* эфирного масла – не менее 1 %, суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-гликозид – не менее 1 %, экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 70 %, – не менее 35 %.

Приготовление растворов

Раствор стандартного образца (СО) лютеолин-7-гликозида. Около 0,020 г (точная навеска) СО лютеолин-7-гликозида, предварительно высушенного при температуре 130-135 °С в течение 3 ч, растворяют в 85 мл спирта 96 % в мерной колбе вместимостью 100 мл при нагревании на водяной бане, охлаждают, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор А СО лютеолин-7-гликозида). Срок годности не более 1 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

1,0 мл раствора А СО лютеолин-7-глиюкозида помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 %, 0,05 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б СО лютеолин-7-глюкозида).

Эфирное масло.

В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных препаратах» (метод 1 или 2, из навески 50,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, время перегонки – 2 ч).

Сумма флавоноидов.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих через сито с отверстиями размером 1 мм.

Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл спирта 70 %. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 20 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья

со стенок. Горячее извлечение фильтруют через вату в мерную колбу вместимостью 100 мл.

Вату помещают в колбу для экстрагирования и прибавляют 30 мл спирта 50 %. Экстракцию повторяют еще дважды в описанных выше условиях, фильтруя извлечение в ту же мерную колбу. Вату, оставшуюся после последнего фильтрования, промывают 10 мл спирта 70 %. Затем объем извлечения доводят спиртом 70 % до метки и перемешивают (раствор А).

2,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл алюминия хлорида раствора 2 %, 0,05 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (испытуемый раствор).

Через 30 мин измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 398 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения. В качестве раствора сравнения используют следующий раствор: 2,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 0,05 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО лютеолин-7-гликозида в аналогичных условиях. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2 мл раствора А СО лютеолин-7-гликозида, 0,05 мл уксусной кислоты разведенной 30 % и доведенный спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-гликозид в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 1 \cdot 100 \cdot \text{P} \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 2 \cdot 100 \cdot 25 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot a_0 \cdot 5000 \cdot \text{P}}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность раствора СО лютеолин-7-гликозида;

a – навеска сырья, г;

a_0 – навеска СО лютеолин-7-гликозида, г;

P – содержание основного вещества в СО лютеолин-7-гликозида, %;

W – влажность сырья, %.

Экстрактивные вещества. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах», (метод 1, экстрагент – спирт 70 %).

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Тмина обыкновенного плоды **ФС.2.5.0098.18**

C***ari carvi fructus*** **Взамен ГФ XI вып. 2 ст. 31**

Собранные зрелые и высушенные плоды дикорастущего или культивируемого двухлетнего травянистого растения тмина обыкновенного – *Carum carvi* L., сем. сельдерейных – *Apiaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Плоды – вислоплодники, состоящие из двух полуплодиков (мерикарпиев), чаще распавшиеся. Мерикарпии продолговатой формы, часто более или менее серповидно-изогнутые, сжатые с боков, к верхушке слегка суженные, с надпестичным диском и остатком столбика. Наружная сторона мерикарпия выпуклая, внутренняя плоская. Каждый мерикарпий имеет пять сильно выступающих продольных ребрышек: три из них находятся на выпуклой стороне, два по бокам. В мерикарпии одно семя, сросшееся с околоплодником. Длина плодов 3-7 мм, ширина 1-1,5 мм. Цвет плодов темно-коричневый с тонкими светлыми полосками на ребрах. Запах сильный, ароматный. Вкус водного извлечения жгучий, горьковатый, пряный.





Рисунок 1. Внешний вид тмина обыкновенного плодов.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* На поперечном срезе мерикарпия должны быть видны: перикарпий (околоплодник) и семя. Эпидермис околоплодника (экзокарпий) состоит из одного слоя овальных клеток. В паренхиме мезокарпия видны проводящие пучки, расположенные в ребрышках. Между ребрышками расположены эфиромасличные канальцы: 2 на плоской стороне и 4 – на выпуклой. Эндокарпий состоит из одного слоя овальных клеток, плотно сросшихся с желто-бурыми сдавленными клетками семенной кожуры. Клетки эндосперма семени имеют утолщенные стенки и содержат алейроновые зерна, капли жирного масла и очень мелкие друзы оксалата кальция.

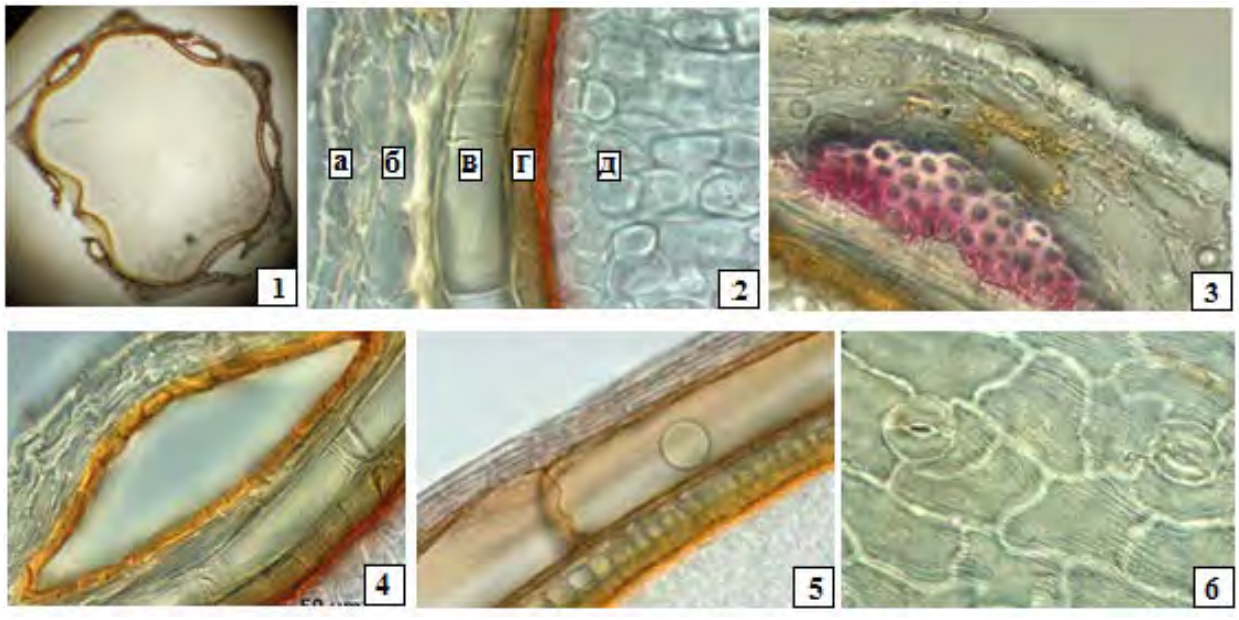


Рисунок 2 – Тмина обыкновенного плоды.

1 – поперечный срез полуплодика (56 ×); 2 – поперечный срез полуплодика: а – экзокарпий (эпидерма) б – мезокарпий; в – эндокарпий; г – кожура семени; д – эндосперм семени (200×); 3 – поперечный срез полуплодика (200×); 4, 5 – эфиромасличные канальцы (280×); 6 – эпидермис (600×).

Определение основных биологически активных веществ

Испытание проводят методами тонкослойной или газовой хроматографии.

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) судана III. Около 0,005 г СО судана III растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор стандартного образца (СО) ментола. Около 0,01 г СО ментола растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном отсвета месте.

Около 1,0 г сырья, измельченного до отсутствия цельных плодов, помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 10,0 мл спирта 96 % и кипятят с обратным холодильником на водяной бане в течение 20 мин. После охлаждения до комнатной температуры извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят в виде полос длиной 10 мм и шириной не более 3 мм 20 мкл (0,02 мл) испытуемого раствора и рядом по 5 мкл (0,005 мл) раствора СО ментола и раствора СО судана III.

Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин смесью растворителей толуол-этилацетат (95:5), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 ÷ 90 % длины пластинки от линии старта, её вынимают из камеры и сушат до удаления следов растворителей. Пластинку обрабатывают ванилина раствором
0,0005 %, выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100 ÷ 105 ºС в течение 2-3 мин, после чего сразу же просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО ментола должна обнаруживаться зона адсорбции сине-фиолетового или сине-голубого цвета; на хроматограмме раствора СО судана III выше должна обнаруживаться зона адсорбции синего или красновато-фиолетового цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должно обнаруживаться не менее 4 зон адсорбции (в порядке возрастания): зона адсорбции розово-

сиреневого цвета, две зоны адсорбции сиреневого цвета на уровне зоны адсорбции раствора СО ментола и зона адсорбции красно-фиолетового цвета между зонами адсорбции растворов СО ментола и СО судана III; допускается обнаружение дополнительных зон адсорбции (терпеноиды).

Газовая хроматография

Испытание проводится методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии.

Для анализа используют испытуемый раствор (см. раздел «Тонкослойная хроматография»).

Условия хроматографирования

Колонка	капиллярная HP-5MS, 30 м × 0,25 мм; толщина пленки неподвижной фазы 0,25 мкм, или аналогичная
Температура колонки, °С	начальная 50 °С, выдержка 2 мин; далее подъем со скоростью 10 °С/мин до 150 °С, выдержка 0 мин; далее подъем со скоростью 15 °С/мин до 280 °С, выдержка 10 мин
Температура инжектора	280 °С
Объем вводимой пробы, мкл	1,0
Деление потока	(20 : 1)
Температура интерфейса	280 °С
Газ-носитель	гелий,
Расход газов, мл/мин	0,8
Сканирование	по полному ионному току, диапазон масс 29 ÷ 500, задержка на выход растворителя 2,5 мин.
Детектор	масс-спектрометрический.

Хроматографируют испытуемый раствор в указанных выше условиях.

На хроматограмме испытуемого раствора должны регистрироваться основные пики лимонена с временем удерживания около 8,05 мин и карвона с относительным временем удерживания (по лимонену) около 1,61.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье* – не более 12 %.

Зола общая. *Цельное сырье*– не более 8 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье* – не более 1,5 %.

Посторонние примеси. *Цельное сырье:* поврежденных, недоразвитых плодов тмина и других частей растения – не более 2 %.

Органическая примесь. *Цельное сырьё* – не более 2,0 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье* – не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырьё:* эфирного масла – не менее 2 %.

Определение эфирного масла проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1 или 2, из

10,0 г сырья, измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, время перегонки 4 ч.)

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Толокнянки обыкновенной листья **ФС.2.5.0099.18**

Arctostaphylos uvae-ursi folia **Взамен ГФ XI вып. 2 ст. 26**

Собранные весной до и в начале цветения или осенью с начала созревания плодов до появления снежного покрова и высушенные листья дикорастущего вечнозеленого кустарничка толокнянки обыкновенной – *Arctostaphylos uva-ursi (*L.*) Spreng.,* семейства вересковых – *Ericaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Смесь цельных или частично измельченных листьев. Листья мелкие, кожистые, ломкие, обратно-яйцевидной или удлиненно-овальной формы, иногда с небольшой выемкой, на верхушке закругленные, к основанию клиновидно-суженные, с очень коротким черешком. Длина листьев 1 – 2,2 см, ширина 0,5 – 1,2 см. Жилкование сетчатое. При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) на верхней поверхности листа жилки заметно вдавлены. Черешки листьев в поперечном сечении округло-треугольной формы.

Цвет листьев с верхней стороны темно-зеленые, блестящие, с нижней стороны немного светлее, матовые, голые. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения сильно вяжущий, горьковатый.

Измельченное сырье. Кусочки листьев различной формы и черешков, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм. При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки листьев различной формы, на верхней поверхности жилки вдавлены. Цвет от светло-зеленого до

темно-зеленого с коричневато-зелеными, светло-коричневыми, коричневыми, редко фиолетовыми и желтовато-белыми вкраплениями. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения сильно вяжущий, горьковатый.

Порошок. Кусочки листьев и черешков, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки листьев с вдавленными жилками на верхней поверхности листа. Цвет порошка от светло-зеленого до темно-зеленого с коричневато-зелеными, светло-коричневыми, коричневыми, редко фиолетовыми и желтовато-белыми вкраплениями. Запах отсутствует, вкус водного извлечения сильно вяжущий, горьковатый.

Микроскопические признаки. *Цельное, измельченное сырье.* При рассмотрении листа с поверхности должно быть видно, что клетки верхнего и нижнего эпидермиса многоугольные с прямыми и довольно толстыми стенками. Устьица располагаются на нижнем эпидермисе. Устьица крупные, округлые, с широко раскрытой устьичной щелью, окружены 8 (5 – 9) клетками эпидермиса (аномоцитный тип). Вдоль крупных жилок располагаются кристаллы оксалата кальция в виде призм, их сростков и друз.

Волоски редкие, изогнутые, 2 – 3 клеточные, встречаются у основания листа и на черешке.

Клетки эпидермиса черешка толстостенные, прозенхимной формы. Эпидермис опушен многочисленными 2 – 3 клеточными волосками. Под эпидермисом в три-четыре слоя залегает колленхима.

Проводящая система черешка представлена одним крупным коллатеральным пучком, расположенным в центре.

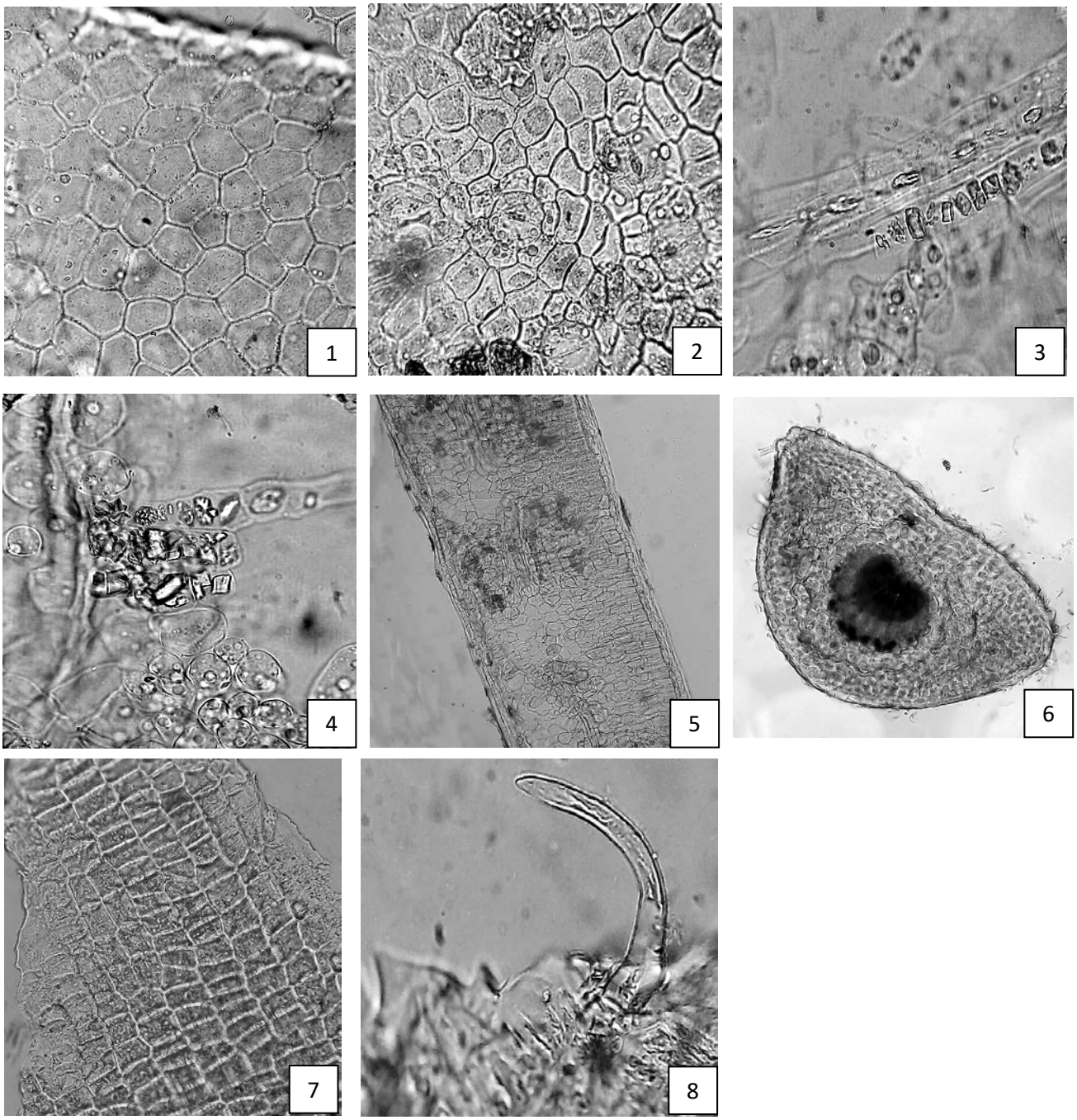


Рисунок – Толокнянки листья

1 – фрагмент верхнего эпидермиса листа (400×); 2 – фрагмент нижнего эпидермиса листа с устьицами (аномоцитный тип) (400×); 3 – фрагмент эпидермиса листа вдоль жилки с кристаллами оксалата кальция в виде призм (400×); 4 - фрагмент мезофилла листа с кристаллами оксалата кальция в виде призм, их сростков и друз (400×); 5 – поперечный срез листа (100×); 6 – поперечный срез черешка (40×); 7 – фрагмент эпидермиса черешка (400×); 8 – фрагмент эпидермиса черешка с 2-клеточным изогнутым волоском (400×).

Порошок. При рассмотрении микропрепарата порошка должны быть видны фрагменты многоугольных клеток эпидермиса с прямыми и довольно толстыми стенками, устьица с 8 (5–9) околоустьичными клетками, с широко раскрытой устьичной щелью (аномоцитный тип); фрагменты волосков простых, слегка изогнутых, 2 – 3 клеточных. На фрагментах листьев в мезофилле должны быть видны редкие одиночные кристаллы оксалата кальция в виде призм, их сростков и друз. В микропрепарате также обнаруживаются фрагменты черешка листа.

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов

Раствор стандартного образца (СО) арбутина. Около 0,01 г СО арбутина помещают в колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 8 мл спирта 70 % и нагревают на водяной бане до полного растворения. Затем раствор охлаждают, доводят объем тем же спиртом до 10 мл и перемешивают.

Срок годности раствора 3 мес.

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 60 мкл (0,06 мл) испытуемого раствора (см. раздел «Количественное определение арбутина», раствор А; 10,0 мл раствора А пропускают через колонку с алюминия оксидом и используют для хроматографирования), рядом наносят 10 мкл (0,01 мл) раствора СО арбутина. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе в течение 5 мин, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин смесью растворителей этилацетат – кислота муравьиная – вода (88:6:6) и хроматографируют восходящим способом.

Когда фронт растворителей пройдет около 80 - 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, обрабатывают натрия фосфорномолибдата раствором 10 %, выдерживают при температуре 100 - 105 °С в течение 10 мин и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО арбутина должна обнаруживаться зона адсорбции синего цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции синего цвета на уровне зоны адсорбции СО арбутина и 2 зоны адсорбции синего цвета выше и ниже зоны адсорбции СО арбутина; допускается обнаружение дополнительных зон адсорбции.

Качественные реакции

Около 0,5 г измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 10 мл воды, присоединяют к обратному холодильнику и кипятят в течение 2 – 3 мин. Затем содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр.

1. К 1 мл фильтрата (в фарфоровой чашке) прибавляют 4 мл раствора аммиака и по каплям 1 мл натрия фосфорномолибдата раствор 10 %; должно наблюдаться синее окрашивание (арбутин).

2. К 2 мл фильтрата (в фарфоровой чашке) прибавляют 0,1 мл железа(III) аммония сульфата раствор 1 %; должно наблюдаться зеленовато-черное окрашивание (дубильные вещества).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 12 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 4 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 2 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье*: частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, – не более 2 %. *Измельченное сырье*: частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, – не более 5 %. Частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %. *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не бо-

лее 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Сырье, изменившее окраску (листьев потемневших с обеих сторон). *Цельное сырье,* измельченное *сырье, порошок* – не более 3 %.

Других частей растения (веточки, плоды). *Цельное сырье* – не более 4%.

Органическая примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 0,5 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок:* содержание арбутина – не менее 6 %, экстрактивных веществ, извлекаемых водой – не менее 18 %.

Содержание арбутина

Приготовления раствора стандартного образца (СО) арбутина. Около 0,1 г (точная навеска) СО арбутина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 80 мл спирта 70 % и нагревают на водяной бане до полного растворения. Затем раствор охлаждают, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор А СО арбутина). Срок годности раствора 3 мес.

7,0 мл раствора А СО арбутина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивают (раствор Б СО арбутина).

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

Около 0,5 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100,0 мл спирта 70 % и взвешивают с погрешностью ± 0,01 г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на водяной бане в течение 45 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Затем колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и при необходимости доводят до первоначальной массы спиртом 70 %. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр, смоченный тем же спиртом, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А испытуемого раствора).

Для очистки полученного извлечения от сопутствующих веществ, 3,0 мл раствора А испытуемого раствора пропускают через стеклянную хроматографическую колонку диаметром 1,5 см и высотой 25 см, заполненную 3,0 г алюминия оксида нейтрального для хроматографии (L 40/250 мкм), предварительно промытую 5 мл спирта 70 %. Далее раствор А элюируют 15,0 мл спирта 70 %. Элюат собирают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора). Оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора измеряют на спектрофотометре при длине волны 285 нм в кювете с толщиной рабочего слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют спирт 70 %, который предварительно пропускают через колонку с алюминия оксидом нейтральным.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО арбутина. В качестве раствора сравнения используют спирт 70 %.

Содержание арбутина в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по следующей формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 7 \cdot 100 \cdot 100 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot 3 \cdot (100 - W) \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100} = \frac{A \cdot a_0 \cdot 175 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot 3 \cdot (100 - W)},$$

где: A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;

A_0 –оптическая плотность раствора Б СО арбутина;

a – навеска сырья, г;

a_0 – навеска СО арбутина, г;

W – влажность сырья, %

Р – содержание основного вещества в СО арбутина, %.

Допускается содержание арбутина в сырье вычислять с использованием удельного показателя поглощения по следующей формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 3 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 250000}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 3 \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения арбутина при длине волны 285 нм, равный 72,23;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Определение экстрактивных веществ, извлекаемых водой, проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (навеска сырья – 1,0 г, экстрагент – вода очищенная).

Примечание. Определение арбутина проводят в сырье, предназначенном для производства лекарственных растительных препаратов (пачка, фильтр-пакеты), экстрактивных веществ, извлекаемых водой, в сырье, предназначенном для производства экстрактов.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Тополя почки **ФС.2.5.0042.15**

Populi gemmae

Собранные с конца осени, зимой или ранней весной до начала распускания и высушенные боковые (пазушные) и верхушечные (терминальные) почки дикорастущих и культивируемых деревьев тополя черного –*Populus nigra*L., тополя бальзамического –*Populus balsamifera* L., тополя канадского –*Populus canadensis* Marsh., тополя лавролистного –*Populus laurifolia* Ledeb. и тополя душистого –*Populus suaveolens* Fisch., сем.ивовых – *Salicaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.*При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) почки вытянутые, конические, заостренные с округлым основанием, на ощупь клейкие. Верхушечные (терминальные) почки имеют яйцевидно-удлиненную форму и заостренную верхушку. Боковые (пазушные) почки имеют коническую форму с округлым основанием. Длина почек от 7 до 25 мм, в поперечнике – от 2 до 9 мм. С поверхности – почки гладкие, блестящие, у краев чешуй – смолистые. Чешуи располагаются по спирали, нижние коричневого цвета – мелкие, округлые, жесткие; верхние – более светлые с зеленоватым оттенком, крупные овальные, конически заостренные. Верхушечные почки имеют 9–12 кроющих чешуй, боковые – 5–7. Края чешуй прилегают плотно, кончики (верхушки) нижних и средних чешуй слегка отогнуты.

Запах характерный, усиливающийся при разламывании почки. Вкус водного извлечения характерный, жгуче-горький.

Микроскопические признаки*.Цельное сырье.*При рассмотрении чешуи почки с поверхности должно быть видно, что клетки эпидермиса наружной стороны слегка вытянутые, с неравномерно утолщенными клеточными стенками и простыми порами, а клетки эпидермиса внутренней стороны –с тонкими прямыми стенками. На верхушке и по краям чешуи на клетках наружного эпидермиса встречаются простые одноклеточные толстостенные кутинизированные, часто обломанные волоски с гладкой поверхностью.

На поперечном срезе чешуи должен быть виден однослойный наружный эпидермис со слегка вытянутыми относительно продольной оси чешуи округлыми или шлемовидными клетками, стенки которых покрыты толстым слоем кутикулы и имеют четковидные утолщения.Внутренний эпидермис чешуи также однослойный, состоит из столбчатых клеток с тонкими стенками, некоторые клеткизаполнены желтоватого цвета содержимым. Клетки внутреннего эпидермиса по краю чешуи – одревесневшие.

Под наружным и внутренним эпидермисом располагается пробка, представленная радиальными рядами клеток филлемы. Наиболее развита пробка в нижних чешуях, а также в верхушках верхних чешуй и центральной наружной части средних и верхних чешуй. У верхних чешуй встречается крайне слабо развитая (1–2 ряда клеток) наружная пробка, а внутренняя – часто отсутствует.

Основная ткань чешуи – рыхлая паренхима, состоящая из клеток с коричневым содержимым. В верхушках чешуи клетки паренхимы одревесневшие. В основной паренхиме чешуи встречаются группы склереид и друзы оксалата кальция.

Проводящие пучки – неполные и представлены в нижней и средней части чешуи трахеидами; в верхушках чешуи проводящие пучки отсутствуют.

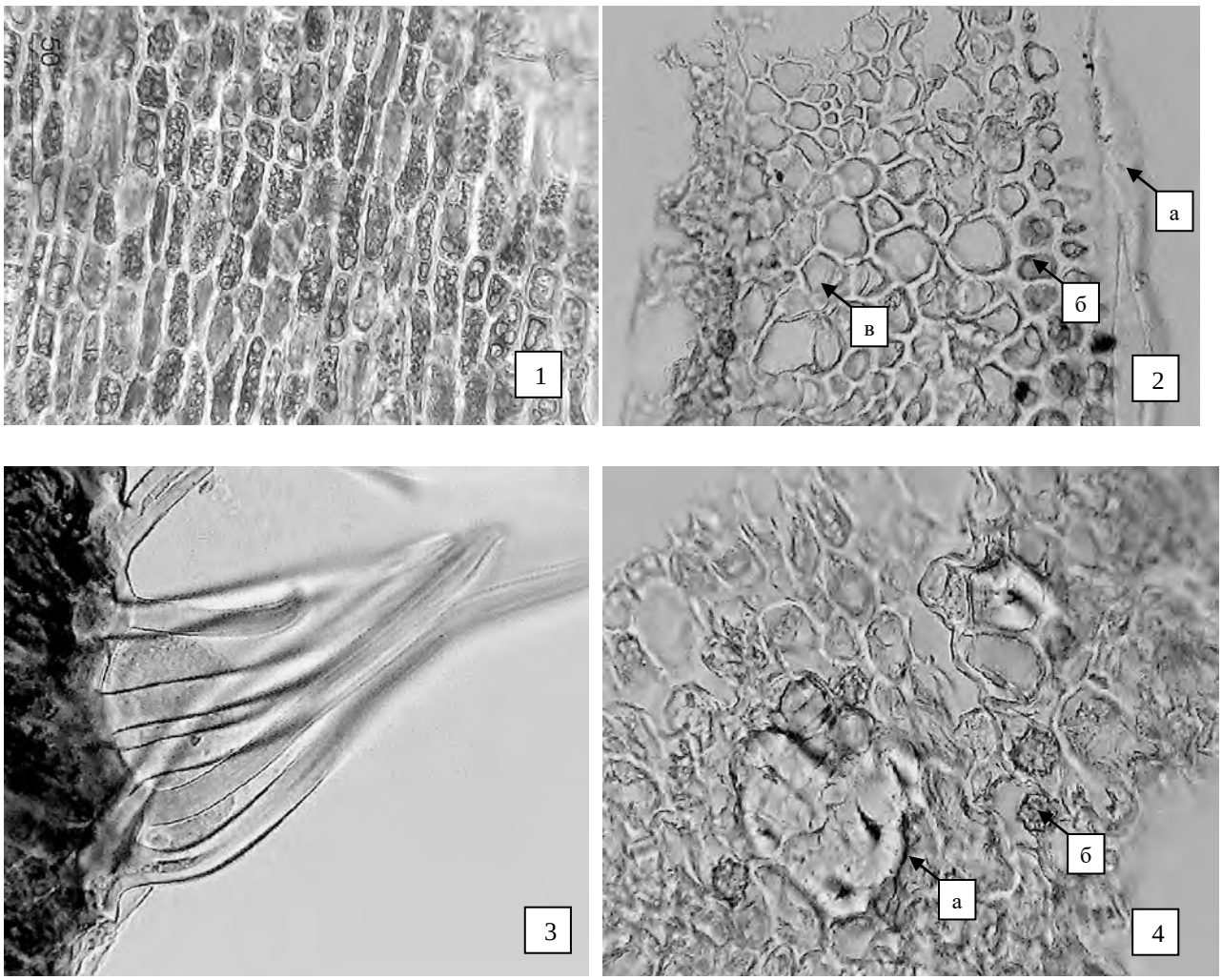


Рисунок – Тополя почки.

1 – фрагмент эпидермиса чешуи (400×); 2 – фрагмент поперечного среза покровной чешуи: кутикула (а), гиподерма с пигментом (б), паренхима (в) (400×); 3 – простые одноклеточные волоски (400×); 4 – фрагмент поперечного среза покровной чешуи: склереиды (а), друзы оксалата кальция (б) (400×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором наносят по 2 мкл испытуемого раствора (см. раздел «Количественное определение. Сумма фенольных соединений» приготовление раствора А испытуемого раствора) и растворастандартного образца (СО)пиностробина (см. раздел «Количественное определение». Сумма фенольных соединений» приготовление раствора А СО пиностробина). Пластинку с нанесенными

пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 1 ч смесью растворителей хлороформ–спирт 96 % (9:1), и хроматографируют восходящим способом.Когда фронт растворителей пройдет около 80 –90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм.

На хроматограмме раствора СОдолжна обнаруживаться зона адсорбции фиолетового цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции фиолетового цвета на уровне зоны адсорбции на СО пиностробина.

Пластинку обрабатывают диазореактивом и выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100–105 °С в течение 2 мин.

На хроматограмме раствора СОдолжна обнаруживаться зона адсорбции оранжевого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции желто-оранжевого цвета на уровне зоны адсорбции СО пиностробина и зона адсорбции оранжевого цвета ниже зоны адсорбции пиностробина; допускается обнаружение других зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье* – не более 8 %.

Зола общая. *Цельное сырье*– не более 10 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье* – не более 1 %.

Посторонние примеси

Веточки, в том числе отделенные при анализе.*Цельное сырье* – не более 10 %.

Почки, тронувшиеся в рост и распустившиеся.*Цельное сырье* – не более 2 %.

Органическая примесь.*Цельное сырье* – не более 1 %.

Минеральная примесь.*Цельное сырье* – не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье:* сумма фенольных соединений в пересчете на пиностробин– не менее 15 %.

Суммафенольных соединений

Приготовление растворов.

Раствор СО пиностробина. Около 0,02 г (точная навеска) СО пиностробина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 80 мл спирта 96 %, растворяют при перемешивании на водяной бане при температуре 75 °С. Затем содержимое колбы охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор АСОпиностробина).

1,0 мл раствора А СО пиностробинапомещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор БСО пиностробина).

Срок годности растворов 30 сут.

Около 1,0 г (точная навеска) цельногосырья помещают в колбу с притертой пробкой вместимостью 100 мл и прибавляют 40 мл спирта 96 %, взвешивают с погрешностью±0,01 г, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане в течение 1 ч. Содержимое колбы охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и доводят спиртом 96 % до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр (раствор А испытуемого раствора).

1,0 мл раствора Аиспытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора).

1,0 мл раствора Биспытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор В испытуемого раствора).

Измеряют оптическую плотность раствора Виспытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 289 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют спирт 96 %.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО пиностробина в тех же условиях.

Содержание суммы фенольных соединений в пересчете на пиностробинв абсолютно сухом сырье в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 40 \cdot 25 \cdot 50 \cdot a_0 \cdot 1 \cdot P \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 1 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 50 \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot a_0 \cdot P \cdot 1000}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где*A*– оптическая плотность раствора В испытуемого раствора;

A_0– оптическая плотность раствора Б СО пиностробина;

a– навеска сырья, г;

a_0– навеска СО пиностробина, г;

P – содержание основного вещества в СО пиностробина, %;

W– влажность сырья, %.

Допускается содержание суммы флавоноидов в пересчете на пиностробин вычислять с использованием удельного показателя поглощения по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 40 \cdot 25 \cdot 50 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot 1 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 5000000}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где *A* – оптическая плотность раствора В испытуемого раствора;

$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения пиностробина при длине волны 289 нм, равный 700;

a– навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Тыквы семена	**ФС.2.5.0100.18**
Cucurbitae semina	**Взамен ГФ XI, вып. 2, ст. 78**

Зрелые, очищенные от остатков мякоти околоплодника и высушенные семена однолетних культивируемых растений тыквы обыкновенной – *Cucurbita pepo* L., тыквы крупной – *Cucurbita maxima* Duch. и тыквы мускатной – *Cucurbita moschata* (Duch.) Poir., сем. тыквенных – *Cucurbitaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырьё*. Семена эллиптические, плотные, слегка суженные с одной стороны, окаймленные по краю ободком. Поверхность семян глянцевая или матовая, гладкая или слегка шероховатая. Кожура семени состоит из двух частей: деревянистой, легко отделяемой и внутренней - пленчатой, плотно прилегающей к зародышу; иногда деревянистая кожура отсутствует (сорт голосемянная). Зародыш состоит из двух желтовато - белых семядолей и небольшого корешка. Длина семени 1,5-2,5 см, ширина 0,8-1,4 см, толщина в средней части семени 0,1-0,4 мм.

Цвет семян белый, белый с желтоватым или сероватым оттенком, реже зеленовато - серый или желтый. Цвет семян голосемянного сорта от желтовато-зеленого до коричневато-зеленого. Запах отсутствует. Вкус семени, очищенного от деревянистой части кожуры, маслянистый, сладковатый.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье*. При рассмотрении поперечного среза семени должны быть видны: семенная кожура, алейроновый слой (недоразвитый эндосперм) и семядоли зародыша. В семенной кожуре эпидермис представлен крупными палисадными клетками с утолщенными и, как правило, волнистыми боковыми стенками и почти всегда разрушенной наружной стенкой. Под эпидермисом расположена мощная склеренхима, в которой раз-

личаются три слоя. Наружная часть склеренхимы состоит из 5-7 рядов, плотно сомкнутых клеток с многочисленными порами. Срединная часть склеренхимы представлена одним слоем очень крупных округлочетырехугольных клеток с толстой слоистой оболочкой и узкими порами. Внутренняя часть склеренхимы в зависимости от вида тыквы содержит от двух до шести рядов клеток звездчатой формы, которые образуют крупные межклетники. К внутренней части склеренхимы примыкает несколько слоев тонкостенных сдавленных клеток. Алейроновый слой представлен одним рядом небольших изодиаметрических клеток, густо заполненных алейроновыми зернами. В клетках семядолей хорошо различим эпидермальный слой из мелких, овальных клеток; далее следуют клетки палисадного слоя. Все они густо заполнены алейроновыми зернами и каплями жирного масла.

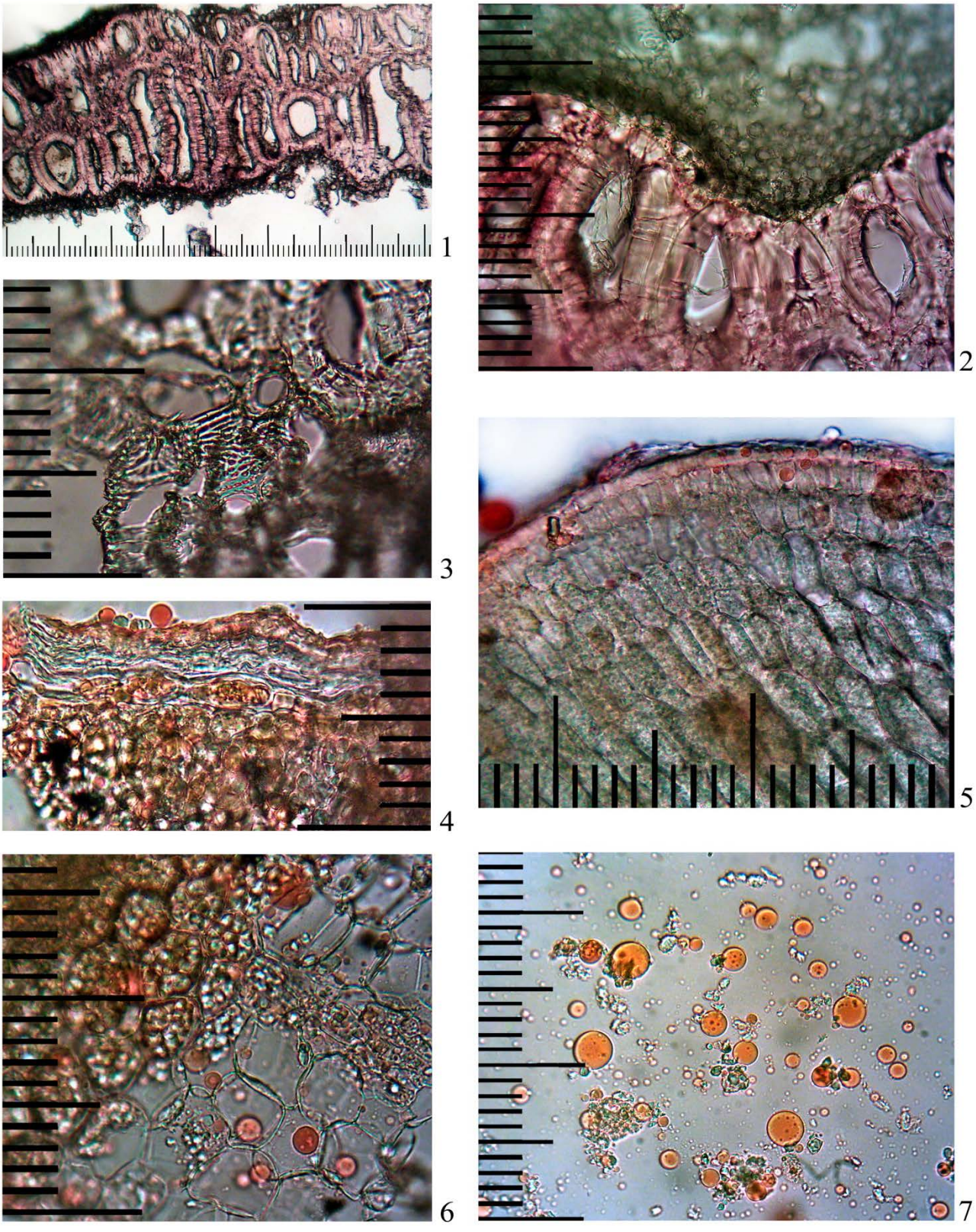


Рисунок 1 – Тыквы семена:
1 - 6 – поперечные срезы (90×), 7 – «давленый» препарат (окраска одревеснев-ших /лигнифицированных элементов и капель жирного масла) (90×); 1,2 – по-перечный срез: склеренхима; 3 – поперечный срез: звездчатые пористые клет-ки; 4 – поперечный срез: алейроновый слой и эпидермальный слой семядоли; 5

– фрагмент поперечного среза семядоли; 6 – поперечный срез: капли жирного масла, 7 – капли жирного масла и алейроновые зерна.

Определение основных групп биологически активных веществ

Приготовление растворов

Нингидрина раствор 0,4 % в ацетоне. 0,4 г нингидрина помещают в мерную колбу вместимостью 100,0 мл, прибавляют 40 мл ацетона, перемешивают, затем доводят объем раствора этим же растворителем до метки и вновь перемешивают.

Тонкослойная хроматография

Около 10,0 обезжиренного шрота (см. раздел «Количественное определение»), высушенного под тягой до полного удаления следов хлороформа, переносят в коническую колбу вместимостью 250 мл, добавляют 100 мл воды и экстрагируют с обратным холодильником в водяной бане в течение 1 ч. После охлаждения содержимое колбы фильтруют в другую колбу вместимостью 250 мл через 6-8 слоев марли. 15,0 мл полученного фильтрата переносят в колбу вместимостью 100 мл и добавляют 45 мл спирта 96 %. Колбу закрывают пробкой и помещают в холодильник с температурой 4 °С на 2-3 ч. Выпавший хлопьевидный осадок отфильтровывают в сухую колбу через ватный тампон, отбрасывая первые 5 мл (испытуемый раствор).

На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят в виде полосы длиной 10 мм и шириной не более 2 мм 80 мкл (0,08 мл) испытуемого раствора.

Пластинку с нанесенной пробой сушат при комнатной температуре в течение 15 мин, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 1 ч смесью растворителей пропанол - муравьиная кислота концентрированная - уксусная кислота ледяная (16:5:5), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей. Пластинку обрабатывают нингидрина раствором 0,4 % в ацетоне, под-

сушивают, выдерживают при температуре 60 °С в течение 20 мин и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме испытуемого раствора должно наблюдаться не менее 4 зон адсорбции (снизу вверх от линии старта): зона серо-коричневого или зелено-коричневого цвета, далее 3 зоны от желто-оранжевого или желто-коричневого цвета до сиреневого или фиолетового цвета; допускается обнаружение других зон адсорбции.

Качественная реакция

Готовые срезы тыквы семян или «давленые» препараты, которые получают при использовании обратного конца препаровальной иглы или скальпеля путем надавливания на кусочки семян, помещают на предметное стекло в 2 – 3 капли раствора судана III, накрывают покровным стеклом и нагревают; должно наблюдаться оранжево-розовое или оранжево-желтое окрашивание капель (жирное масло).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье* – не более 13 %.

Зола общая. *Цельное сырье* – не более 5 %.

Зола, нерастворимая в растворе хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье* – не более 0,5 %.

Посторонние примеси.

Другие части растения, не соответствующие установленному описанию сырья (части околоплодника в виде отделившихся пленок и остатков сухой мякоти). *Цельное сырьё* – не более 0,2 %.

Пустые и поврежденные семена. *Цельное сырье* – не более 2 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье* – не более 0,5 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье* – не более 0,1 %.

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжёлых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье:* содержание суммы липофильных веществ – не менее 35 %.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

Около 10,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в патрон из фильтровальной бумаги, который переносят в аппарат Сокслета с экстрактором объемом 150-300 мл, к экстрактору присоединяют круглодонную колбу вместимостью 500 мл, предварительно высушенную в течение 1 ч при 100-105 °С и взвешенную по окончании охлаждения, и помещают в водяную баню. Экстрагируют хлороформом до полного обесцвечивания извлечения в экстракторе (около 6-8 часов). По окончании процесса экстракции растворитель отгоняют на роторном испарителе при температуре 50-60 °С и высушивают полученный комплекс липофильных веществ в сушильном шкафу при температуре 100-105 °С до постоянной массы.

Содержание суммы липофильных веществ в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{a_1 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot (100 - W)},$$

где a_1 – масса сухого остатка, в граммах;

a – навеска сырья, в граммах;

W – влажность сырья, в процентах.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Тысячелистника обыкновенного трава **ФС.2.5.0101.18**

Achilleae millefolii herba **Взамен ГФ XI ст. 53 (изм. № 2 от 16.06.1999)**

Собранная в фазу цветения, высушенная трава дикорастущего и культивируемого многолетнего травянистого растения тысячелистника обыкновенного – *Achillea millefolium* L., сем. астровых – *Asteraceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье*. Цельные или частично измельченные цветоносные побеги. Стебли округлые, опушенные, с очередными листьями, длиной до 15 см. Листья длиной до 10 см, шириной до 3 см, продолговатые, дважды-перисторассеченные на ланцетные или линейные доли. Корзинки продолговато-яйцевидные, длиной 3-4 мм, шириной 1,5-3 мм, в щитковидных соцветиях или одиночные. Обвертки их из черепитчатых продолговато-яйцевидных листочков с перепончатыми коричневатыми краями. Цветоложе корзинок с пленчатыми прицветниками. Краевые цветки язычковые пестичные, срединные – трубчатые обоеполые.

Цвет стеблей и листьев серовато-зеленый, реже – красновато-зеленый; краевых цветков – белый, реже розовый, срединных – желтый или серовато-желтый; листочков обвертки – серовато-коричневый. Запах слабый, ароматный. Вкус водного извлечения пряный, горьковатый.

Измельченное сырье. Кусочки листьев, стеблей, цветочных корзинок и отдельные цветки, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) должны быть видны серовато-зеленые кусочки листьев, рассеченных на узкие линейные доли; кусочки округлых стеблей серовато-зеленого или

красновато-зеленого цвета; цельные продолговато-яйцевидные корзинки или их фрагменты; отдельные трубчатые и язычковые цветки и их фрагменты белого, бело-розового, желтого или серовато-желтого цвета; кусочки листочков обвертки корзинок серовато-коричневого цвета.

Цвет от серовато-зеленого до желтовато-зеленого с желтовато-белыми, светло-зелеными, белыми, красновато-зелеными и серовато-коричневыми вкраплениями. Запах слабый, ароматный. Вкус водного извлечения пряный, горьковатый.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье, измельченное сырье.* При рассмотрении микропрепаратов листа должны быть видны фрагменты с эпидермисом из удлиненных клеток с извилистыми стенками и складчатой кутикулой, устьицами аномоцитного типа с 4-5 околоустьичными клетками и многочисленными простыми волосками, состоящими из 4-7 коротких тонкостенных клеток, лежащих в основании, и очень длинной конечной, слегка извилистой клетки с узкой нитевидной полостью, часто обломанной, эфирномасличные железки овальной формы с поперечной перегородкой, состоящие из 8 (6) выделительных клеток, расположенных в 2 ряда и 3-4 яруса, жилки сопровождаются секреторными ходами с желтовато-коричневым зернистым или маслянистым содержимым; трубчатые и язычковые цветки или их фрагменты с эпидермисом из клеток с извилистыми стенками или сосочковидными выростами (бугорчатый эпидермис), эфирномасличными железками, волосками, мелкими друзами оксалата кальция; фрагменты листочков обвертки, состоящие из узких удлиненных клеток с утолщенными пористыми стенками и секреторным ходом вдоль центральной жилки; фрагменты стебля с теми же диагностическими признаками, что и у листьев (тип устьичного препарата, волоски, железки); шиповатые пыльцевые зерна.

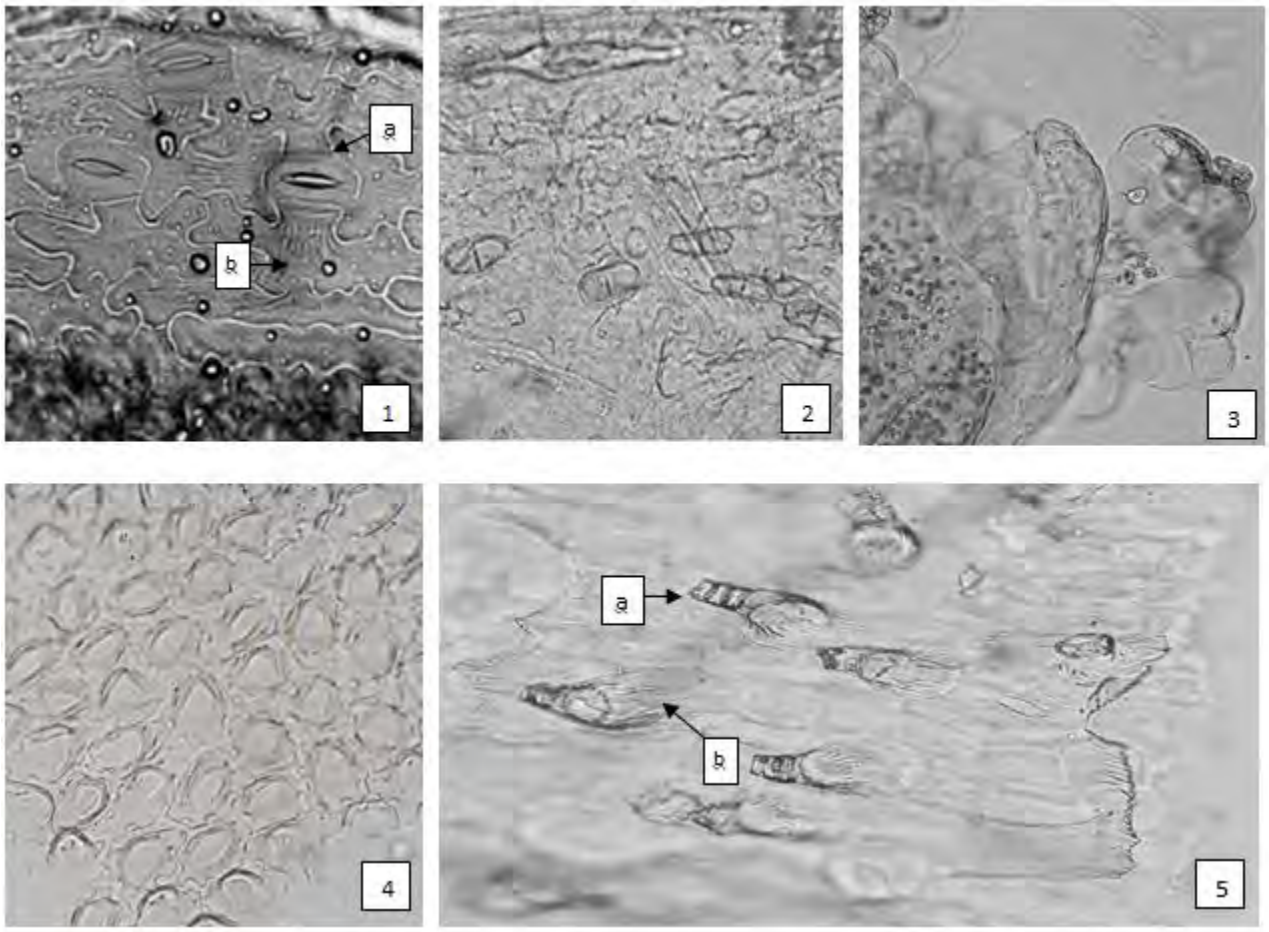


Рисунок – Тысячелистника обыкновенного трава.
1 – фрагмент эпидермиса листа: а – устьица аномоцитного типа, б – складчатость кутикулы (200×); 2 – фрагмент эпидермиса с эфирномасличными железками (100×); 3 – фрагмент венчика трубчатого цветка с двухрядными эфирномасличными железками (200×); 4 – фрагмент эпидермиса язычкового цветка с сосочковидными выростами (200×); 5 – фрагмент эпидермиса листа: а – многоклеточные основания простых волосков, б – складчатость кутикулы (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) судана III. Около 0,001 г СО судана III растворяют в 10,0 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около 2 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, помещают в коническую колбу с

пробкой вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл этилацетата и выдерживают на ультразвуковой бане в течение 15 мин. После охлаждения до комнатной температуры полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля в виде полос длиной 10 мм, шириной не более 3 мм наносят 40 мкл (0,04 мл) испытуемого раствора и параллельно 3 мкл (0,003 мл) раствора СО судана III. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре в течение 5 мин, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин смесью растворителей толуол – этилацетат (95:5) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 - 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей. Затем пластинку обрабатывают анисового альдегида раствором спиртовым сернокислым (2), сушат в сушильном шкафу при 100-105 °С в течение 2 - 5 мин и сразу просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО судана III должна обнаруживаться зона адсорбции синего или сине-фиолетового цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должно обнаруживаться не менее четырех зон адсорбции фиолетового, сине-фиолетового или фиолетово-синего цвета: две зоны ниже уровня зоны адсорбции СО судана III и две зоны выше уровня зоны адсорбции СО судана III; допускается обнаружение других зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 13 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 15 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3 %.

Измельченность сырья. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Стебли толще 3 мм. *Цельное сырье* – не более 3 %.

Сырье, изменившее окраску (темно-коричневое и почерневшее). *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1,5 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье*, *измельченное сырье:* суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин – не менее 0,4 %; *цельное сырье:* эфирного масла – не менее 0,1 %, *измельченное сырье:* эфирного масла – не менее 0,08 %.

Сумма флавоноидов

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм. Около 1,5 г (точная

навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл спирта 96 %, содержащего 1 % хлористоводородной кислоты концентрированной, колбу взвешивают с погрешностью ± 0,01 г, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 1,5 ч. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры и взвешивают, при необходимости доводят спиртом 96 % до первоначальной массы. Содержимое колбы фильтруют через бумажный складчатый фильтр, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 1,0 мл раствора А, прибавляют 3,0 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 %, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б).

Через 40 мин измеряют оптическую плотность раствора Б на спектрофотометре при длине волны 400 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл раствора А, доведенного спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин и абсолютно сухое сырье в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 25 \cdot 50 \cdot 100}{A_{1см}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)},$$

где:

А – оптическая плотность раствора Б;

$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса лютеолина с алюминия хлоридом при длине волны 400 нм, равный 549,41;

а – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Эфирное масло

В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 3, из 20,0 г сырья, измельченного до

величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, прибавляют 400 мл воды, время перегонки 2 ч).

Примечания

1. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин определяют в сырье, предназначенном для получения водных, спиртовых, спирто-водных извлечений, экстрактов.
2. Содержание эфирного масла определяют в сырье, предназначенном для получения эфирного масла.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Укропа пахучего плоды **ФС.2.5.0043.15**

Anethi graveolentis fructus

Собранные зрелые и высушенные плоды культивируемого однолетнего травянистого растения укропа пахучего (огородного) – *Anethum graveolens* L., сем. сельдерейных – *Apiaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки*. Цельное сырье.* Отдельные полуплодики (мерикарпии), реже цельные плоды (вислоплодники) длиной 3 – 7 мм, шириной 1,5 – 4 мм, овальные, слабовыпуклые снаружи и плоские на внутренней стороне; каждый полуплодик с 3 нитевидными спинными ребрами и 2 плоскими крыловидными боковыми.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны: цельные голые овальные полуплодики (мерикарпии) светло-коричневые, коричневато-серые или коричневые, иногда с зеленым оттенком; снаружи – слабовыпуклые, с тремя заметными нитевидными спинными ребрышками более светлого цвета, между которыми располагаются 4 секреторных эфирномасличных канальца; с внутренней стороны – плоские, с 2 выпуклыми полулунными эфирномасличными канальцами, которые могут быть частично разрушены; по краям полуплодика – коричневато-белые, иногда с зеленым оттенком, краевые ребра – крылья; на верхушке мерикарпия заметны остатки пятизубчатой чашечки.

Цвет полуплодиков светло-коричневый, коричневато-серый или коричневый, иногда с зеленым оттенком, с более светлыми спинными ребрами и коричневато-белыми, иногда с зеленым оттенком – краевыми

ребрами. Запах сильный, характерный. Вкус водного извлечения сладковато-пряный, несколько жгучий.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* На поперечном срезе мерикарпия видны тангентально вытянутые клетки эпидермиса (экзокарпия) с толстыми стенками; мезокарпий, состоящий из паренхимных клеток с тонкими или слегка утолщенными стенками, в ребрышках видны проводящие пучки с группами механических волокон; в ложбинках расположены эфирномасличные канальцы: 4 – на спинной (выпуклой) стороне и 2 – на брюшной (плоской) стороне, канальцы различных размеров с коричневыми выделительными клетками; эндокарпий, плотно сросшийся с семенной кожурой, заметен в виде темной полосы; семя полукруглой формы; эндосперм семени, состоящий из многоугольных толстостенных клеток, заполненных алейроновыми зернами, каплями жирного масла и мелкими друзами оксалата кальция.

При рассмотрении под микроскопом «давленого» препарата плода видны фрагменты эпидермиса (экзокарпия) из полигональных тонкостенных клеток с умеренно выраженной четковидной утолщенностью стенок, с устьицами аномоцитного типа, устьица небольшие, встречаются редко; фрагменты мезокарпия из клеток с тонкими, слегка утолщенными стенками; фрагменты эфирномасличных канальцев различного размера с коричневыми выделительными клетками; фрагменты проводящих пучков с группами механических волокон; фрагменты эндокарпия из очень узких поперечных клеток; фрагменты семени, включающие тонкостенные коричневатые клетки семенной кожуры и группы многоугольных толстостенных клеток эндосперма, заполненных алейроновыми зернами, каплями жирного масла и мелкими друзами оксалата кальция; цельный зародыш или его фрагменты.

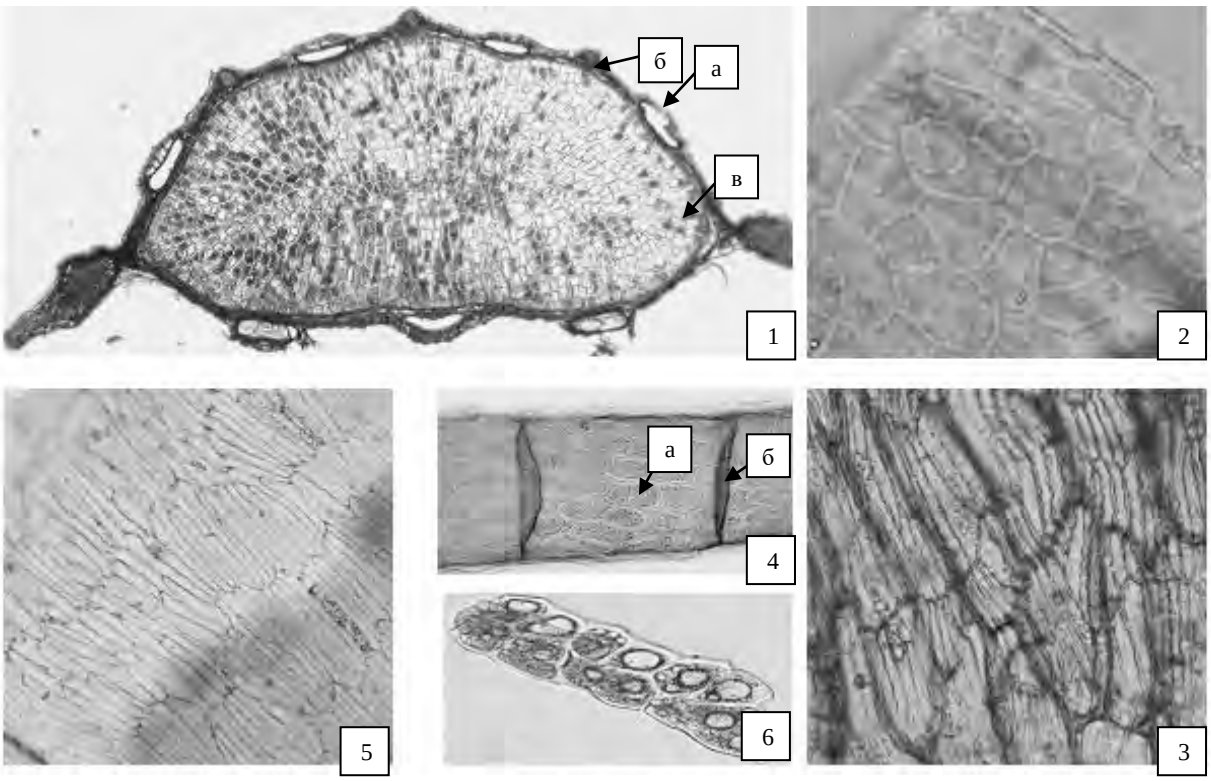


Рисунок – Укропа пахучего плоды.
1 – поперечный срез полуплодика: а – эфирномасличные канальцы,
б – проводящие пучки в ребрышках, в – эндосперм семени (40×);
2 – клетки эпидермиса (экзокарпия) (200×); 3 – паренхима мезокарпия (200×);
4 – фрагмент септированного (с поперечными перегородками)
эфирномасличного канальца: а – коричневые выделительные клетки,
б – поперечные перегородки (200×); 5 – эндокарпий (200×);
6 – клетки эндосперма с мелкими друзами оксалата кальция и каплями
жирного масла (200×)

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) судана III. Около 0,005 г СО судана III растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор СО ментола. Около 0,01 г СО ментола (левоментола) растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около 1,0 г сырья, измельченного до отсутствия цельных плодов, помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл спирта 96 % и кипятят с обратным холодильником на

водяной бане в течение 20 мин. После охлаждения до комнатной температуры извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля в виде полос длиной 10 мм и шириной не более 3 мм наносят 20 мкл испытуемого раствора и рядом по 5 мкл раствора СО судана III и раствора СО ментола.

Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин смесью растворителей толуол – этилацетат (95:5), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры и сушат до удаления следов растворителей. Пластинку обрабатывают анисового альдегида раствором уксуснокислым в этаноле, выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100 – 105 ºС в течение 2 – 3 мин после чего сразу же просматривают при дневном свете.

На хроматограмме растворов СО судана III и СО ментола должна обнаруживаться зона адсорбции синего или красновато-фиолетового цвета (судана III) и под ней зона адсорбции сине-фиолетового или сине-голубого цвета (ментол).

На хроматограмме испытуемого раствора должно обнаруживаться не менее 3 зон адсорбции: зона адсорбции красного цвета с оранжевым или слабым коричневым оттенком между зонами адсорбции СО судана III и СО ментола, зона адсорбции фиолетового или серо-синего цвета выше зона адсорбции СО судана III, над ней зона адсорбции синего или фиолетово-синего цвета; допускается обнаружение дополнительных зон адсорбции (терпеноиды).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье* – не более 12 %.

Зола общая. *Цельное сырье* – не более 10 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье*– не более 1 %.

Посторонние примеси

Другие части растения. *Цельное сырье* – не более 1 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье* – не более 2 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье* – не более 1 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье:* эфирного масла – не менее 2 %.

Определение эфирного масла проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 2, время перегонки – 2,5 ч).

Около 10,0 г (точная навеска) неизмельченных плодов измельчают в ступке с прибавлением 3,0 г кварцевого песка или битого стекла, предварительно просеянного от пыли сквозь сито с отверстиями размером 0,25 мм, в течение не более 2 мин или измельчают на лабораторной мельнице до отсутствия цельных плодов, время измельчения – не более 2 мин.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование

лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Фенхеля обыкновенного плоды **ФС.2.5.0102.18**

Foeniculi vulgaris fructus **Взамен ГФ XI вып. 2 ст. 33**

Собранные зрелые и высушенные плоды культивируемого двухлетнего и многолетнего травянистого растения фенхеля обыкновенного – *Foeniculum vulgare* Mill., сем. сельдерейных – *Apiaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Плоды – вислоплодники, распадающиеся на два полуплодика (мерикарпия). Мерикарпий продолговатой, почти цилиндрической формы, голый. На верхушке имеются остатки пятизубчатой чашечки и надпестичный диск с двумя расходящимися столбиками. Наружная сторона мерикарпия выпуклая, внутренняя – плоская. Каждый мерикарпий с пятью сильно выступающими продольными ребрышками: три из них находятся на выпуклой стороне и два более развитых – по бокам. Семя в мерикарпии одно, сросшееся с околоплодником. Длина плодов 4-10 мм, ширина 1,5-4 мм. Цвет плодов зеленовато-коричневый, коричневый. Запах сильный, ароматный. Вкус водного извлечения сладковато-пряный.



Рис. 1. Внешний вид фенхеля обыкновенного плодов.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* На поперечном срезе мерикарпия должен быть виден эпидермис (экзокарпий), состоящий из одного слоя овальных клеток. В мезокарпии ребрышек проходят проводящие пучки, окруженные овальными или округлыми клетками с сетчатым утолщением. Между ребрышками расположены крупные эфиромасличные канальцы: с наружной стороны мерикарпия их 4, с внутренней – 2. Эфиромасличные канальцы окружены слоем клеток с коричневыми оболочками. Эндокарпий плотно сросшийся с семенной кожурой, желтовато-коричневого цвета. Клетки эндосперма семени заполнены алейроновыми зернами, каплями жирного масла и мелкими друзами оксалата кальция.

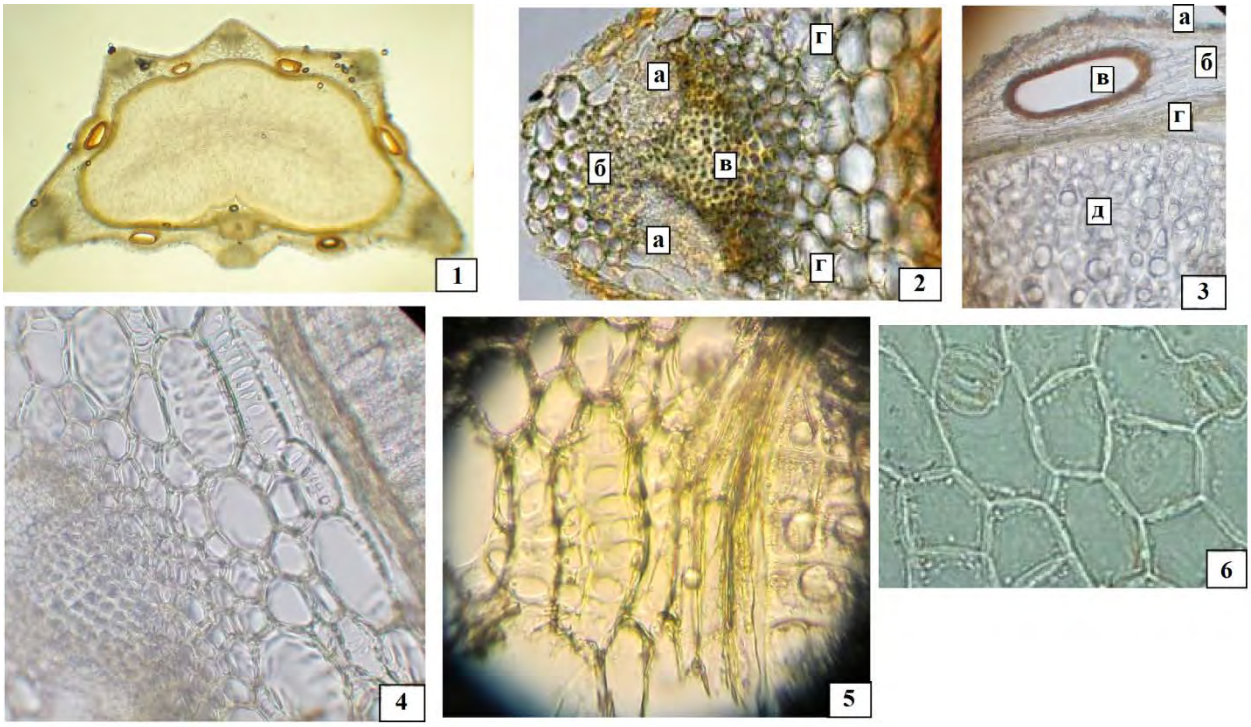


Рисунок 2. Фенхеля обыкновенного плоды.

1– поперечный разрез полуплодика(56×); 2 – ребро полуподика: а – сетчатые клетки; б – сосудисто-волокнистый пучок, в – трахеиды; г – мезокарпий (200×); 3– поперечный разрез полуплодика: а – экзокарпий, б – мезокарпий, в – эфиромасличный каналец, г –эндокарпий, д – эндосперм семени(400×); 4– ребро полуплодика. Сетчатые клетки (300×); 5 – сетчатые клетки(400×); 6 – эпидермис (600×).

Определение основных биологически активных веществ

Испытание проводят методами тонкослойной или газовой хроматографии.

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) судана III. Около 0,005 г СО судана III растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор стандартного образца (СО) ментола. Около 0,01 г СО ментола растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Ванилина раствор. В колбе вместимостью 100 мл смешивают последо-

вательно: 0,5 мг ванилина, 10,0 мл уксусной кислоты ледяной, 85,0 мл спирта 96 % и 5,0 мл серной кислоты концентрированной. Срок годности раствора 1 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около 1,0 г сырья, измельченного до отсутствия цельных плодов помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл спирта 96 % и кипятят с обратным холодильником на водяной бане в течение 20 мин. После охлаждения до комнатной температуры извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят в виде полосы длиной 10 мм и шириной не более 3 мм 20 мкл (0,02 мл) испытуемого раствора и рядом по 5 мкл (0,005 мл) раствора СО ментола и раствора СО судана III.

Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин смесью растворителей толуол-этилацетат (95:5), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 ÷ 90 % длины пластинки от линии старта, её вынимают из камеры и сушат до удаления следов растворителей. Пластинку обрабатывают ванилина раствором
0,0005 %, выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100 ÷ 105 ºС в течение 2 - 3 мин, после чего сразу же просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО ментола должна обнаруживаться зона адсорбции сине-фиолетового или сине-голубого цвета, на хроматограмме раствора СО судана III выше должна обнаруживаться зона адсорбции красновато-фиолетового цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться не менее 5 зон адсорбции (в порядке возрастания): зона адсорбции сиреневого цвета, зона адсорбции фиолетового цвета на уровне зона адсорбции СО ментола, зона адсорбции желтого цвета, зона адсорбции фиолетового цвета между зонами адсорбции СО ментола и СО судана III; зона адсорбции сине-

фиолетового цвета над зоной адсорбции СО судана III; допускается обнаружение дополнительных зон адсорбции (терпеноиды).

Газовая хроматография

Испытание проводится методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии.

Для анализа используют испытуемый раствор (см. раздел «Тонкослойная хроматография»).

Условия хроматографирования:

Колонка	капиллярная HP-5MS 30 м × 0,25 мм; толщина пленки неподвижной фазы 0,25 мкм или аналогичная
Температура колонки, °С	начальная 50 °С, выдержка 2 мин; подъем 10 °С/мин до 150 °С, выдержка 0 мин; подъем 15 °С/мин до 280 °С, выдержка 10 мин
Температура инжектора:	280 °С
Объем вводимой пробы, мкл	1 мкл
Деление потока	(20 : 1)
Температура интерфейса:	280 °С
Газ-носитель:	гелий,
Расход газов, мл/мин	0,8 мл/мин
Сканирование	по полному ионному току, диапазон масс 29 ÷ 500, задержка на выход растворителя 2,5 мин;

Детектор масс-спектрометрический.

Хроматографируют испытуемый раствор в указанных выше условиях. На хроматограмме испытуемого раствора должны регистрироваться основные пики: фенхона с временем удерживания около 9,1 мин и анетола с относительным временем удерживания (по фенхону) около 1,32.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье* – не более 14 %.

Зола общая. *Цельное сырье* – не более 10 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье* – не более 1,0 %.

Посторонние примеси. *Цельное сырье:* поврежденных, недоразвитых плодов фенхеля и других частей растения – не более 1 %.

Органическая примесь. *Цельное сырьё* – не более 1,6 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье* – не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье:* эфирного масла – не менее 3 %.

Определение эфирного масла проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1 или 2, из 15,0 г сырья, измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, время перегонки 4 ч.)

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Фиалки трава **ФС.2.5.0044.15**

Violae herba

Собранная в фазу массового цветения и высушенная трава одно- или двухлетнихдикорастущих травянистых растений фиалки трехцветной – *Violatri color* L.и фиалки полевой –*Viola arvensis* Murr.,сем.фиалковых – *Violaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Смесь цельных или частично измельченных олиственных стеблей с цветками и плодами разной степени развития, отдельных стеблей, листьев, цветков, плодов. Стебли простые или ветвистые, слаборебристые, внутри полые, длиной до 25 см. Листья очередные, обычно черешковые, простые, с 2 крупными лировидными перисторассеченными или перисторазделными прилистниками; нижние – широкояйцевидные, верхние – продолговатые, по краю тупозубчатые или крупногородчатые, длиной до 6 см, шириной до 2 см. Цветки одиночные, неправильные. Чашечки из 5 зеленых овальных или ланцетовидных чашелистиков. Венчик из 5 неравных лепестков, нижний крупнее остальных со шпорцем у основания. У фиалки полевой лепестки короче чашечки или почти равны ей, у фиалки трехцветной – лепестки длиннее чашечки. Плод – одногнездная продолговато-яйцевидная коробочка, раскрывающаяся 3 створками. Семена мелкие, овальные, гладкие.

Цвет листьев – зеленый, стеблей – зеленый, светло-зеленый или желтовато-зеленый, верхних лепестков у фиалки трехцветной – темно-фиолетовый, светло-фиолетовый или синий, у фиалки полевой – светло-

желтый или белый, иногда слабо-фиолетовый, средних лепестков у фиалки трехцветной – фиолетовый, сине-фиолетовый или желтый, у фиалки полевой – светло-желтый, нижних лепестков у фиалки трехцветной – желтый с 5–7 темными продольными полосами, по краюфиолетовый, у фиалки полевой – желтый, у основания с5–7 темными продольными полосами, по краю светло-желтый; плодов – зеленый, желтовато-зеленый, зеленовато-желтый;семян – светло-коричневый. Запах слабый.Вкус водного извлечения сладковатый, слизистый.

*Измельченное сырье.*Смесь кусочков стеблей, листьев, цветков, плодов различной формы, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет от светло-зеленого до зеленого с желтовато-белыми, светло-желтыми, синими, фиолетовыми, желтовато-зелеными, зеленовато-желтыми, светло-коричневыми вкраплениями.Запах слабый.Вкус водного извлечения сладковатый, слизистый.

*Порошок.*Смесь кусочков стеблей, листьев, цветков, плодов, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Цвет от светло-зеленого до зеленого с желтовато-белыми, светло-желтыми, синими, фиолетовыми, желтовато-зелеными, зеленовато-желтыми, светло-коричневыми вкраплениями.Запах слабый.Вкус водного извлечения сладковатый, слизистый.

Микроскопические признаки.*Цельное, измельченное сырье.* При рассмотрении препаратов листа и чашелистика с поверхности должно быть видно, что клетки верхнего эпидермиса со слабоизвилистыми стенками, нижнего – с более извилистыми. Устьица расположены на верхнем и нижнем эпидермисе, окружены 3–4 околоустьичными клетками (аномоцитный тип). Замыкающие клетки устьиц имеют почковидную форму. Волоски 2 типов – простые и головчатые. Простые волоски одноклеточные, нежно-бородавчатые, с толстыми стенками, расширены у основания и заострены на конце, располагаются преимущественно на жилках и по краю листа. Головчатые волоски с многоклеточной головкой на широкой

многоклеточной ножке, встречаются только по краю листа, в углублениях между зубцами. В мезофилле листа видны многочисленные крупные друзы оксалата кальция. При рассмотрении лепестков с поверхности видны клетки верхнего эпидермиса с сосочковидными выростами. На эпидермисе средних и нижних лепестков, у основания, располагаются длинные одноклеточные тупоконечные волоски с тонкими стенками. На нижнем лепестке, при входе в шпорец располагаются извилистые длинные одноклеточные бугорчатые волоски. В паренхиме нижней части лепестков встречаются друзы оксалата кальция.

Клетки эпидермиса стебля прямые, вытянутые по длине. Волоски эпидермиса стебля простые, многоклеточные, заостренные на верхушке.

Створка плода на поперечном срезе состоит из центральной части и 2 крыльев. Экзокарпий створки образуют 3–5 рядов тонкостенных клеток эпидермиса. При рассмотрении с поверхности клетки имеют удлиненную форму и прямые стенки, встречается множество устьиц аномоцитного типа. Мезокарпий центральной части состоит из 2 слоев склеренхимных волокон с пористыми одревесневшими стенками и паренхимы. Волокна верхнего слоя сильно утолщены и вытянуты параллельно поверхности створки, волокна нижнего слоя имеют менее выраженное утолщение и расположены перпендикулярно ее поверхности. Под склеренхимой в окружении паренхимы располагается несколько проводящих пучков. Паренхима состоит из нескольких слоев клеток с толстыми стенками, округлых на поперечном срезе. В нижних слоях обнаруживаются друзы и скопления мелких призматических кристаллов оксалата кальция. Внутренняя поверхность створки плода (эндокарпий) состоит из одного ряда клеток эпидермиса прямоугольной формы со слегка волнистыми или прямыми стенками на продольном срезе. Крыло створки образовано мощным слоем склеренхимных пористых толстостенных волокон, вытянутых параллельно его поверхности. В слое экзокарпия в месте соединения крыла и центральной части

располагается проводящий пучок. В состав проводящих пучков створки входят спиральные, кольчатые, лестничные и сетчатые сосуды.

При рассмотрении поперечного среза семени должны быть видны кожура в виде желтой или светло-коричневой полосы, эндосперм и зародыш. При большом увеличении различают слои семенной кожуры. В «давленом» препарате эпидермис состоит из клеток изодиаметрической формы с прямыми стенками, покрытых толстым слоем кутикулы и содержащих слизь. Некоторые из клеток имеют сетчатое утолщение. Под эпидермисом располагается пигментный слой, состоящий в «давленом» препарате из клеток удлиненно-прямоугольной формы с прямыми стенками, содержащих окрашивающий пигмент желтого или светло-коричневого цвета. К нему примыкает слой округлых клеток с утолщенными стенками, содержащих призматические кристаллы оксалата кальция, и далее слой, состоящий из толстостенных склеренхимных плотносомкнутых волокон, вытянутых параллельно поверхности семени. Под ним находится слой, образованный на поперечном срезе из одного ряда паренхимных клеток.

Клетки эндосперма тонкостенные, изодиаметрической формы и содержат капли жирного масла (реакция с суданом III) и мелкие алейроновые зерна. Самый наружный слой эндосперма состоит из мелких толстостенных клеток.

Порошок. При рассмотрении порошка обоих видов должны быть видны фрагменты клеток эпидермиса листьев и чашелистиков с извилистыми стенками и с устьицами аномоцитного типа, окруженными 3–4 околоустьичными клетками, замыкающие клетки устьиц имеют почковидную форму; простые одноклеточные, толстостенные, нежно-бородавчатые волоски с расширенным основанием и заостренной верхушкой; головчатые волоски с многоклеточной головкой на широкой многоклеточной ножке; фрагменты мезофилла листа с многочисленными друзами оксалата кальция; фрагменты венчика цветка с извилистыми эпидермальными клетками, сосочковидными выростами клеток эпидермиса, длинными

одноклеточными извилистыми бугорчатыми волосками и друзами оксалата кальция в паренхиме; редкие фрагменты спиральных и сетчатых сосудов и групп волокон из стебля.

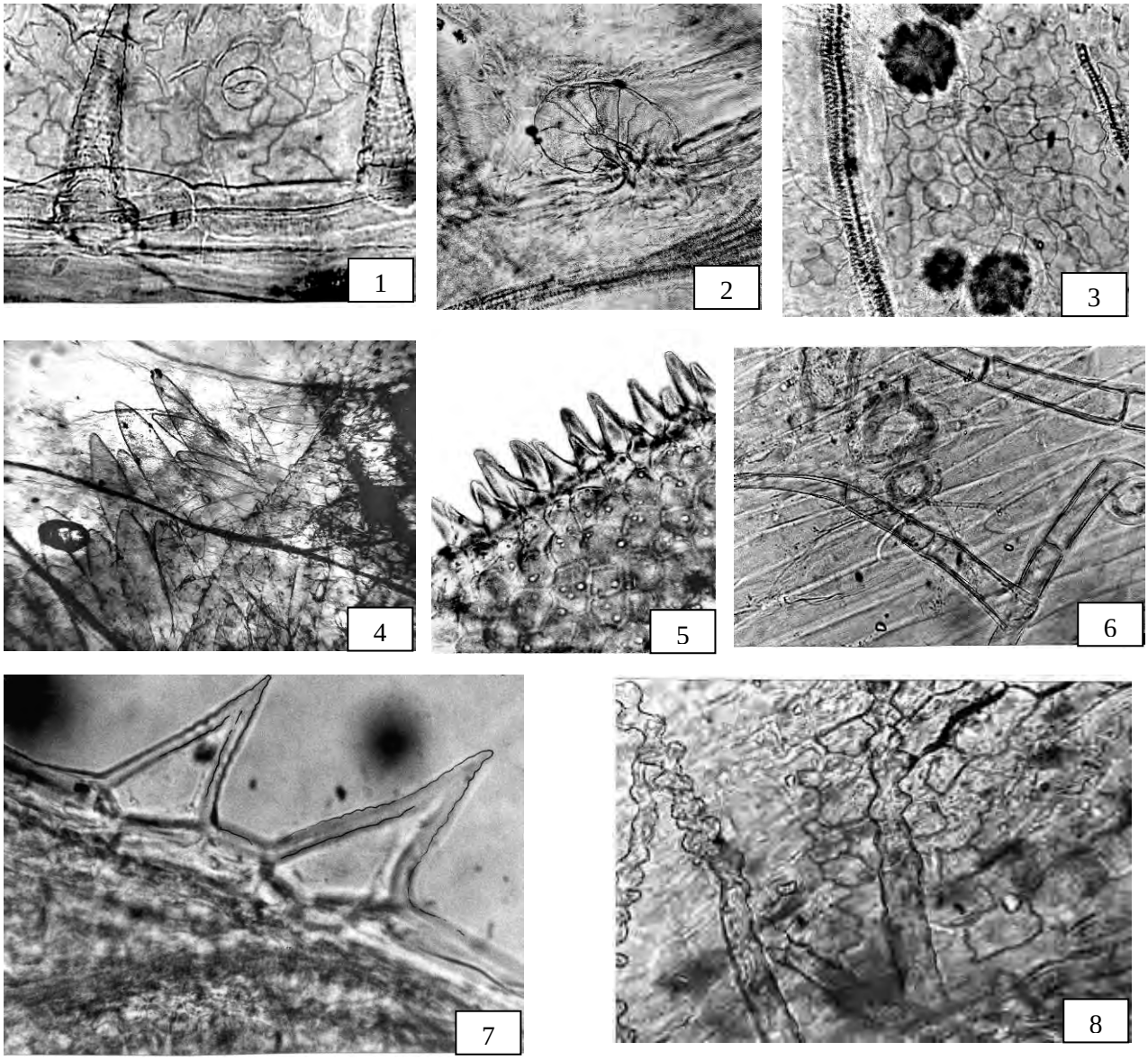


Рисунок – Фиалки трава.
1 – фрагмент эпидермиса листа с простыми одноклеточными нежно-бородавчатыми волосками и устьицамианомоцитного типа (200×), 2 – фрагмент края листа с головчатым волоском (200×), 3 – фрагмент эпидермиса листа с жилкой и друзами оксалата кальция (200×), 4 – фрагмент эпидермиса лепестков венчика цветка с тупоконечными простыми одноклеточными волосками (200×), 5 – фрагмент верхнего эпидермиса лепестков венчика цветка с сосочковидными выростами (200×), 6 – фрагмент эпидермиса стебля с простыми многоклеточными волосками (200×), 7 – фрагмент эпидермиса чашечки цветка с простыми одноклеточными нежно-бородавчатыми волосками (200×), 8 – фрагмент эпидермиса лепестков

венчика цветка с извилистыми длинными одноклеточными бугорчатыми волосками (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

1. Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов

*Раствор стандартного образца (СО) рутина.*Около 0,005 г рутина (рутина тригидрата) растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около 1,0 г сырья,измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл спирта 96 %, нагревают с обратным холодильником на водяной бане в течение 5 мин, затем извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 10 мкл испытуемого раствора и 5 мкл раствора СО рутина. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре в течение 5 мин, помещают в камеру предварительно насыщенную в течение 40 мин смесью растворителей этилацетат - муравьиная кислота безводная - вода (65:15:20) и хроматографируют восходящим способом.Когда фронт растворителей пройдет 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры и сушат до удаления следов растворителей (под тягой при комнатной температуре). Затем хроматограмму обрабатывают последовательно дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира раствором 1 % в спирте96 %и макрогола 400 раствором спиртовым 5 %, выдерживают в сушильном шкафу при температуре 105-110 °С в течение 3-5 мин.

Затем хроматограмму рассматривают в УФ-свете при длине волны365 нм.

На хроматограмме раствора СО рутина должна обнаруживаться зона адсорбции с флюоресценцией желто-оранжевого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должно обнаруживаться не менее двух зонадсорбции:зонаадсорбции с флуоресценцией ярко-желтого цветанижезоныадсорбцииСОрутинаизонаадсорбциис флуоресценциейжелто-оранжевого цветапримерно на уровне зоныадсорбции СО рутина. Допускается наличие дополнительных 3-4 зон, в том числе зоны адсорбции желтой флуоресценции выше зоныадсорбции рутина (флавоноиды).

2. ***Качественные реакции***

К 5 мл раствора А (см. раздел «Количественное определение. Полисахариды») прибавляют 15 мл спирта 96 %; выпадает объемистый осадок (полисахариды).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок*– не более 14 %.

Зола общая. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* – не более 13 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* – не более 3 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %. *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм,– не более 5 %, частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Пожелтевшие листья и стебли/кусочки листьев и стеблей. *Цельное сырье*, *измельченное сырье* – не более 7 %.

Другие части растения (плоды, створки плодов, корней). *Цельное сырье,измельченное сырье* – не более 3 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье,измельченное сырье* – не более 3 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок*– не более 1 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок:* сумма флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 1 %, сумма полисахаридов – не менее 8 %, экстрактивных веществ, извлекаемых водой, – не менее 30 %.

Сумма флавоноидов

Приготовление растворов.

Раствор СО рутина. Около 0,1 г (точная навеска) СО рутина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 85 мл спирта 70 % и нагревают на водяной бане до полного растворения. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора до метки тем же спиртом и перемешивают(раствор АСО рутина). Срок годности раствора 3 мес.

1,0 мл раствора А СО рутина, 5 мл алюминия хлорида раствора 5 % в спирте 70 %, 1 мл уксусной кислоты раствора 3 % (прибавленного через 10 мин), помещенных в мерную колбу вместимостью 25 мл, доведенных спиртом 70 % до метки (раствор Б СО рутина).

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска)измельченногосырьяпомещаютвколбусо шлифом вместимостью

250 мл, прибавляют 100 млспирта 70 % и взвешивают с погрешностью ± 0,01 г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на водяной бане в течение45 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Затем колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и,при необходимости, доводят до первоначальной массыспиртом 70 %. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр, смоченный тем же спиртом, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А испытуемого раствора).

2,0 мл раствора Аиспытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл алюминия хлоридараствора 5 % в спирте 70 %и через 10 мин –1 млуксусной кислоты раствора 3 %,доводят объем раствора тем же спиртом до метки, перемешивают (раствор Б испытуемогораствора).

Оптическую плотность раствора Биспытуемого раствора измеряют через 30 мин на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из2,0 мл раствора А испытуемого раствора, 1 мл уксусной кислоты раствора 3 %, доведенный спиртом 70 %до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО рутина.В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из1,0 мл раствора А СО рутина,1 мл уксусной кислоты раствора 3 %, доведенный спиртом 70 %до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете нарутини абсолютно сухое сырье в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot a_0 \cdot 1 \cdot P \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 2 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot a_0 \cdot P \cdot 50}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где*A*– оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;

$A_о$– оптическая плотность раствора Б СО рутина;

a – навеска сырья, г;

$a_о$– навеска СО рутина, г;

P– содержание основного вещества в СО рутина, %;

W– влажность сырья, %.

Допускается содержание суммы флавоноидов в пересчете нарутинвычислять с использованием удельного показателя поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридомпо формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 2 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 125000}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где*A*– оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;

$A_{1см}^{1\%}$ –удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при длине волны 410 нм, равный 249;

a – навеска сырья, г;

W– влажность сырья, %.

Полисахариды.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Около 10,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 500 мл, прибавляют 200 мл воды очищенной, нагретой до кипения. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и кипятят при перемешивании на электрической плитке в течение 30 мин. Экстракцию повторяют ещё 2 раза, используя по 200 мл и 100 мл воды соответственно.

Водные извлечения объединяют и фильтруют в мерную колбу вместимостью 500 мл через 5 слоёв марли, вложенной в стеклянную воронку и предварительно промытой водой очищенной. Фильтр промывают водой и доводят объём раствора тем же растворителем до метки (раствор А).

25,0 мл раствора А помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 75 мл спирта 96 %, перемешивают, подогревают на водяной бане в течение 30 мин. Содержимое колбы фильтруют через предварительно высушенный и взвешенный беззольный бумажный фильтр. Осадок на фильтре последовательно промывают 15 мл раствора спирта 96 % в воде очищенной (3:1), 10 мл смеси этилацетата и спирта 96 % (1:1). Фильтр

с осадком высушивают сначала на воздухе, затем при температуре 100–105 °С до постоянной массы.

Содержание полисахаридов в абсолютно сухом сырье в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 500 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot 25 \cdot (100 - W)} = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 200000}{a \cdot (100 - W)},$$

где m_1 – масса фильтра, г;
m_2 – масса фильтра с осадком, г;
a – навеска сырья, г;
W – влажность, %.

Экстрактивные вещества. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1, навеска сырья 1,0 г, экстрагент – вода очищенная.).

Примечание

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и экстрактивных веществ, извлекаемых водой, определяют в траве фиалки, предназначенной для получения водных извлечений; содержание экстрактивных веществ, извлекаемых водой, и суммы полисахаридов определяют в траве фиалки, предназначенной для получения водно-спиртовых экстрактов.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хвоща полевого трава **ФС.2.5.0045.15**

Equiseti arvensis herba

Собранные в течение лета и высушенные надземные вегетативные побеги многолетнего травянистого дикорастущего растения хвоща полевого – *Equisetum arvens e*L., сем.хвощевых – *Equisetaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки.*Цельное сырье.*Цельные и частично измельченные стебли длиной до 30 см, жесткие, членистые, бороздчатые, с 6–18 продольными ребрышками, почти от основания мутовчато-ветвистые, с полыми междоузлиями и утолщениями в узлах. Ветви неразветвленные, членистые, косо вверх направленные, 4–5-гранные, без полости. Влагалища стеблей цилиндрические, длиной 4–8 мм, с треугольно-ланцетными, темно-коричневыми, белоокаймленными по краю зубцами, спаянными по 2–3. Влагалища веточек зеленые с 4–5 коричневатыми длинноottянутыми зубчиками. При обрывании ветвей на стебле удерживаются только первые короткие членики.

Цвет серовато-зеленый. Запах слабый.Вкус водного извлечения слегка кисловатый.

Измельченное сырье. Кусочки стеблей и ветвей частично с узлами и влагалищами, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки ветвей, четырех–пятиребристых, без полости на срезе, без листовых влагалищ, иногда с влагалищами или с их остатками. Отдельно встречаются целые влагалища и их части. Влагалища стеблей – зубчатые

трубочки, серовато-зеленые, коричневые и темно-коричневые со спаянными по 2–3 треугольно-ланцетными коричневыми зубцами; влагалища ветвей – серовато-зеленые с длиннозаостренными зубцами, светло коричневыми, зелеными или зелеными со светло коричневой каймой. Реже встречаются кусочки стебля (междоузлия и узлы) в поперечном и продольном сечении. Кусочки стебля в поперечном сечении ребристо-бороздчатые с центральной крупной полостью и мелкими полостями (под бороздами).

В продольном сечении кусочки стебля (междоузлия), с одной стороны– ребристые серовато-зеленые, с другой – гладкие, слегка продольно слоистые, блестящие светло-желтые. Кусочки стебля, соответствующие узлам, с одним или несколькими мелкими коричневыми влагалищами ветвей. При рассматривании полости узла может быть видна перегородка или ее остаток.

При рассмотрении под стереомикроскопом (32×) видна поверхность кусочков ветвей, стеблей, влагалищ серовато-зеленого цвета, покрытая мелкими беловатыми сосочками. Гребни ребер с беловатыми зубчатыми выростами. На большинстве кусочков, у основания ребер вдоль бороздок, расположены 2 – 2 (реже 1, 4) ряда более крупных, чем сосочки, беловатых образований с лучистой складчатостью поверхности – устьица. Замыкающие клетки устьиц расположены на уровне клеток эпидермиса. Кусочки стеблей в продольном сечении, с одной стороны– ребристые, зеленые, с беловатыми зубчатыми гребнями, с другой –продольно-слоистые, светло-желтые, блестящие. На поперечном сечении кусочков стебля, в коре под бороздками, видны полости.

Цвет серовато-зеленый, желтовато-зеленый со светло-желтыми и коричневыми вкраплениями. Запах слабый.Вкус водного извлечения слегка кисловатый.

Порошок. Кусочки стеблей, ветвей, влагалищ, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

При рассмотрении под стереомикроскопом (32×) видны мелкие беловатые сосочки. Вдоль бороздок расположены 2 – 3 (реже 1–4) ряда более

крупных, чем сосочки, беловатых образований с лучистой складчатостью поверхности – устьица. Замыкающие клетки устьиц расположены на уровне клеток эпидермиса. Кусочки ветвей в поперечном сечении с 4 – 5 ребрами, без полости. Гребни ребер с зубчатыми выростами. Видны отдельные зубцы (редуцированные листья) стеблевых влагалищ, треугольно-ланцетные плоские, спаянные или не спаянные, коричневые.

Цвет порошка серовато-зеленый с желтоватыми, беловатыми и коричневатыми вкраплениями. Запах слабый.Вкус водного извлечения слегка кисловатый.

Микроскопические признаки.*Цельное сырье, измельченное сырье.* При рассмотрении с поверхности эпидермиса стебля, ветвей, листовых влагалищ и зубцов (редуцированных листьев) должны быть видны клетки на ребрах, сильно удлиненные (вытянутые по оси роста) с утолщенными прямыми или слегка извилистыми, пористыми стенками. Клетки в бороздках короче, их длинные стенки извилистые (угловато и округло зазубренные), пористые. На коротких стенках (стыках) клеток эпидермиса, расположенных на вершине ребер (гребнях), видны выросты, имеющие (с поверхности) вид спаренных кружочков с ясно выраженной перегородкой. При рассмотрении выростов сбоку видно, что на стеблях зубцы иногда сглаженные (закругленные), на ветвях зубцы наклонные, острые, перегороженные. На поверхности клеток эпидермиса ребер также имеются многочисленные мелкие сосочковидные выросты. Устьица расположены в основании ребер обычно в 2 – 3 ряда (реже в 4 и 1 ряд) и сопровождают бороздку. Они слегка погруженные, с характерной лучистой складчатостью кутикулы. У зубцов с наружной стороны над жилкой расположен ряд парных устьиц, иногда с внутренней стороны, на верхушке над жилкой имеется крупное устьице (гидатода).

На поперечном срезе стебля под эпидермисом в ребрах и в бороздках должны быть видны участки округлых клеток с утолщенными стенками (колленхима).

Клетки паренхимы округлые, тонкостенные, наружный слой хлорофиллоносный (хлоренхима) образует сплошное кольцо, внутренний рыхлый, в нем под бороздками располагаются крупные полости. Проводящие пучки закрытые (без камбия), расположены в 1 ряд под ребрами, отделены от коры слабозаметной эндодермой и имеют небольшую полость. Центральная часть стебля (междоузлия) полая. На поперечном и продольном срезах стебля в области узла видна разделительная перегородка центральной полости соседних междоузлий. На продольных срезах стебля видны тяжи механической ткани (колленхима), расположенной в ребрах и бороздках. Клетки колленхимы узкие, длинные с пропитанной кремнеземом стенкой. Сосуды древесины междоузлий с кольчатым утолщением стенок по длине равны междоузлию. Флоэма состоит из ситовидных элементов и паренхимы. В узлах, по сравнению с междоузлиями, возрастает количество ксилемы. Сосуды здесь короткие, почти изодиаметрические с сетчатыми, пористыми (простыми или окаймленными порами) стенками.

Порошок. При рассмотрении микропрепаратов порошка должны быть видны кусочки, чаще в продольном и реже в поперечном сечении, ветвей, стеблей, влагалищ и зубцов. Клетки эпидермиса с сильно удлиненными, прямыми или слегка извилистыми, утолщенными, пористыми стенками или с удлиненными, сильноизвилистыми, пористыми стенками. На коротких стенках (стыках) клеток эпидермиса, соответствующих гребням, видны выросты, с поверхности имеющие вид спаренных кружочков, при рассмотрении сбоку они закругленные или зубчатые с ясно выраженной перегородкой. Поверхность большинства клеток с мелкими сосочковидными выростами. Должны быть видны фрагменты эпидермиса со слегка погруженными устьицами, имеющими характерную лучистую складчатость кутикулы. На некоторых кусочках устьица частично разрушены или вместо них видны овальные отверстия. На кусочках ветвей продольного сечения, соответствующих наружной поверхности, видны эпидермис с зубчатыми и сосочковидными выростами и устьица с лучистой складчатостью. На

кусочках ветвей продольного сечения, соответствующих внутренней части, видна рыхлая сердцевина с клетками, содержащими хлорофилл, по краям могут быть видны зубчатые и мелкие сосочковидные выросты или выпуклые с лучистой складчатостью устьица. Видны части влагалищ и зубцов с центральной жилкой, над которой располагаются парами по всей длине жилки, устьица с лучистой складчатостью. На верхушках зубцов иногда видны крупные устьица.

На кусочках продольного сечения стебля видны группы сосудов ксилемы с различным утолщением стенок (спиралевидным, кольчатым, сетчатым, реже пористым).

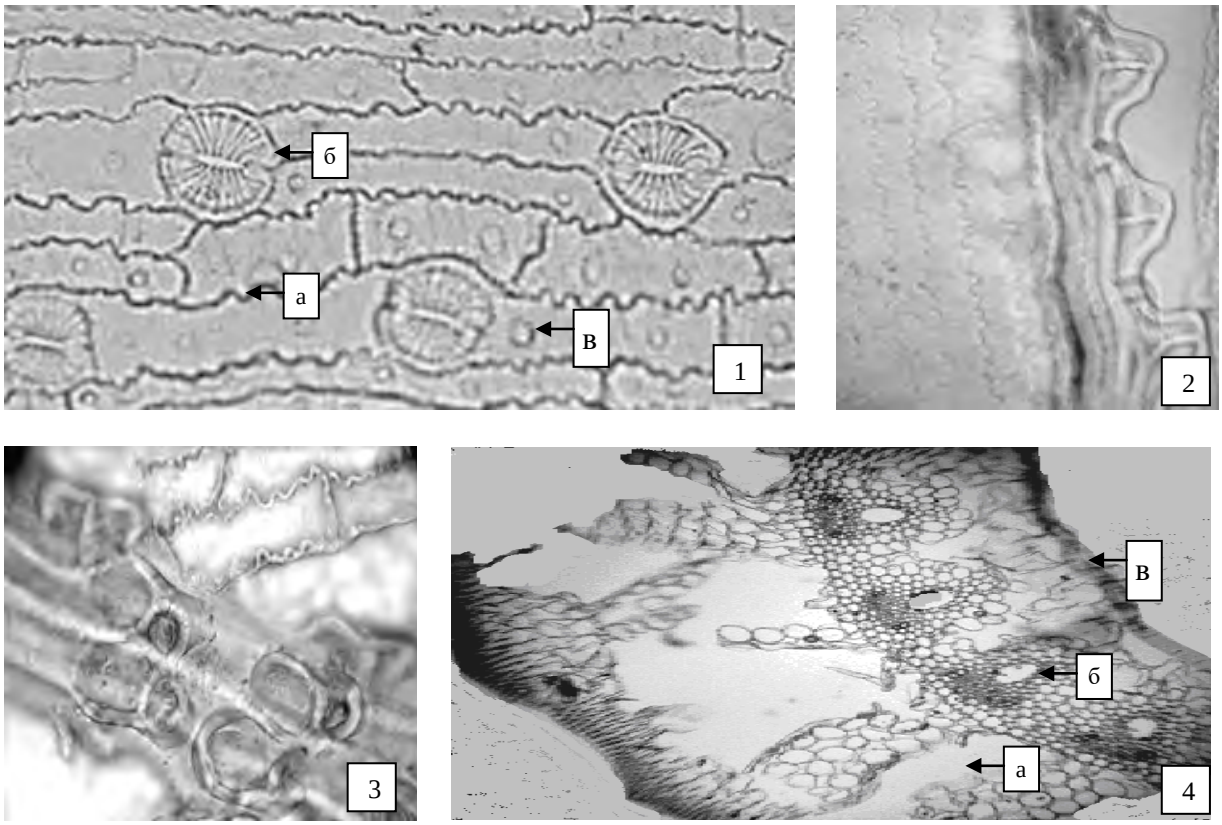


Рисунок – Хвоща полевого трава.
1 – фрагмент эпидермиса членика веточки: а – сильноизвилистые стенки эпидермиса, б– устьица с характерной складчатостью кутикулы, в– сосочковидные выросты (200×); 2 – выросты на ребре членика веточки (вид с боку) (200×); 3 – выросты на ребре членика веточки (вид сверху) (200×); 4 – фрагмент поперечного сечения стебля: а –крупная полость (в коре), б–проводящий пучок (с маленькой полостью), в – эндодерма (100×).

Примечание.

К другим видам хвощей, встречающимся в сырье как примесь, относят:

а) *Хвощ лесной* (*Equisetumsylvaticum* L.) имеет нежесткий стебель с вторично ветвящимися, отклоненными вниз, тонкими ветвями. В верхней части стебля на ребрах в стереомикроскоп (32×) заметны 2 ряда роговидных выростов (шипиков). Зубцы влагалищ на стебле сросшиеся и в сырье легко обламываются. Веточки с 3–5 ребрами. На верхушках встречаются тупые колоски. При рассмотрении эпидермиса стебля с поверхности в бороздках видны один (два) ряда устьиц. Ребра гладкие, но местами по краям заметны крупные выросты в виде зубцов или сосочков. Стенки клеток ребер ветвей слабоволнистые.

б) *Хвощ луговой (Equisetumpratense* L.) имеет ветви с почти горизонтальным расположением, дуговидно книзу отогнутые. Зубцы влагалищ неспаянные. На верхушках стеблей могут быть тупые колоски. В верхней части стебля по ребрам видны множественные, острые конусовидные выросты (сосочки), хорошо заметные под лупой (10×) или в стереомикроскоп (32×). Веточки с 3 ребрами. Под микроскопом видно, что выросты на эпидермисе ребрышек расположены в несколько рядов. В бороздках один, реже два ряда устьиц. Стенки клеток ребер ветвей слегка волнистые. На стеблях имеются поперечные кольчатые выросты.

в) *Хвощ речной* (синонимы топяной, приречный) (*Equisetumfluviatile* L.) имеет мощный стебель толщиной около 0,5 см и высотой от 20 до 150 см. На верхушках стеблей встречаются тупые колоски. При рассмотрении под лупой (10×) видно, что ветви очень короткие, малочисленные или отсутствуют. При рассмотрении в стереомикроскоп (32×) видно, что влагалища с многочисленными зубцами (от 18 до 20). При рассмотрении эпидермиса стебля под микроскопом с поверхности видны гладкие ребра, чередующиеся с широкими бороздами, несущими по 10–12 рядов устьиц в ширину. По краю ребер видны зубцы.

г) *Хвощ болотный* (*Equisetumpalustre*L.). На верхушке стеблей могут быть тупые колоски. При рассмотрении под лупой (10×) видно, что стеблевые влагалища с неспаянными, снабженными широкой белой каймой зубцами, влагалища ветвей на стебле черного цвета. При отрывании ветвей на стебле удерживаются не только влагалища, но и первые членики. Поверхность стеблей и ветвей поперечно–морщинистая. Под микроскопом при рассмотрении эпидермиса стебля и ветвей с поверхности видны устьица, расположенные несколькими рядами. Ребра стеблей и ветвей несут заостренные зубцы. На поперечном срезе ветвей имеется центральная полость, у стебля отсутствует колленхима в бороздках.

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Около 2,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1мм, помещают в плоскодонную коническую колбу со шлифом вместимостью 50 мл, прибавляют 20 мл спирта 96 %, настаивают в закрытой колбе при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем колбу с содержимым присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане в течение 30 мин,охлаждают до комнатной температуры и фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагелянаносят 20 мкл испытуемого раствора. Пластинку с нанесенной пробой сушат, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 30 мин смесью растворителей хлороформ – метанол (3:1), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80–90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и просматривают в УФ-светепридлине волны 254 и 365нм.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться не менее 2 зон адсорбции с флуоресценцией ярко-голубого и красного цвета в УФ-свете при 254 нм или с флуоресценцией фиолетово-голубого и ярко-красного цвета в УФ-свете при 365 нм; допускается обнаружение других зон адсорбции (флавоноиды).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок*– не более 13 %.

Зола общая. *Цельное сырье,измельченное сырье*, *порошок*–не более 24 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* – не более 12 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье:*

частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %. *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм,– не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Другие части растения (корневища, корни).*Цельное сырье,измельченное сырье* – не более 1 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье,измельченное сырье* – не более 1 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок*– не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок:* суммы флавоноидов в пересчете на кверцетин – не менее 0,3 %.

Сумма флавоноидов

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих через сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в круглодонную колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл спирта 96 %, содержащего 2,0 мл хлористоводородной кислоты разведенной 10 %. Колбу с содержимым присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане в

течение 30 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. После охлаждения полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл, так чтобы частицы сырья не попали на фильтр. Экстрагирование повторяют дважды в описанных выше условиях. Извлечения фильтруют в ту же мерную колбу. После охлаждения объем доводят спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор А).

1,0 мл раствора Апомещаютв мерную колбу вместимостью 25 мл, 4 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 %, 3 капли хлористоводородной кислоты раствора 10 % и доводят объем раствора спиртом 96 % до метки (раствор Б).

Оптическую плотность раствораБизмеряют на спектрофотометре при длине волны 430 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм через 30 мин. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1,0 мл раствора А, 3 капель хлористоводородной кислоты раствора 10 % и доведенный спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на кверцетин иабсолютно сухое сырье в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 250000}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где *A*– оптическая плотность раствора Б;

$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения кверцетина при длине волны 430 нм, равный 764,6;

a – навеска сырья, г;

W– влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных

препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хмеля обыкновенного соплодия **ФС.2.5.0046.15**

Humuli lupul ifructus

Собранные в начале созревания и высушенные соплодия многолетнего культивируемого и дикорастущего травянистого растения хмеля обыкновенного –*Humulus lupulus* L., сем. коноплевых –*Cannabaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки.*Цельное сырье.*Смесь соплодий шаровидных, овально-цилиндрических продолговатых или яйцевидных длиной от 2,5 до 5,0 см и шириной 1,5–2 см. Соплодия состоят из сидячих овальных или яйцевидных прицветных чешуй длиной 1–1,5 см, шириной 0,15–0,9 см, черепитчато-расположенных на коленчатой оси (стерженьке). Жилкование прицветных чешуй дугонервное, переходящее к верхушке в сетчатонервное. Край прицветных чешуй цельный, верхушка заостренная. У основания прицветные чешуи имеют складку, где размещается плод – округлый приплюснутый орешек коричневого или коричнево-фиолетового цвета длиной 2–3 мм, шириной 2 мм. Плод и основание прицветных чешуй покрыты мелкими блестящими смолистыми, легко отделяемыми лупулиновыми железками оранжево-желтого цвета.При рассмотрении сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) заметно опушениеприцветных чешуй с обеих сторон, с нижней стороны жилки выпуклые, покрыты более длинными волосками, стерженьки также опушены. Плод округлый, с гладкой, блестящей поверхностью или покрыт железками, имеет острую верхушку и 2 ребрышка по бокам.Цвет соплодий желтовато-зеленый, золотисто-зеленый, зеленовато-желтый или желтовато-коричневый,

прицветные чешуи могут иметь светло-коричневые кончики. Запах характерный. Вкус водного извлечения горький и жгучий.

*Измельченное сырье.*Смесь частиц соплодий от желтого, желтовато-зеленого, зеленого до желтовато-коричневого цвета, различной формы, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм. При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки опушенных прицветных чешуй, стерженьков, лупулиновые железки, встречающиеся иногда на прицветных чешуях, чаще –отдельно поодиночке или слипшись по несколько штук, изредка плоды. Запах характерный. Вкус водного извлечения горький и жгучий.

Микроскопические признаки.*Цельное сырье, измельченное сырье.* При рассмотрении микропрепаратов частиц прицветных чешуй с поверхности должны быть видны клетки с извилистыми тонкими стенками и складчатой кутикулой, местами клеточные стенки с неравномерным утолщением (верхний эпидермис), немногочисленные устьица аномоцитного типа (нижний эпидермис). Клетки, расположенные вдоль жилок и по краю прицветных чешуй, несколько вытянуты и имеют утолщенные стенки. Трихомы представлены волосками: головчатыми с 1–2-клеточной ножкой и 1–4-клеточной головкой, часто встречающимися одноклеточными тонкостенными волосками с заостренным концом, реже 3–4-клеточными. По краю прицветных чешуй расположены простые одноклеточные волоски с расширенным основанием.

Железки, часто отделенные от поверхности чешуй, состоят из 1–2-клеточной ножки и головки из большого числа многоугольных тонкостенных клеток. В мезофилле прицветных чешуй находятся друзы оксалата кальция, чаще вблизи жилок, а также клетки губчатой паренхимы с крупными межклетниками (аэренхима). В "давленом" препарате плода встречаются фрагменты околоплодника с извилистыми клетками экзокарпия.

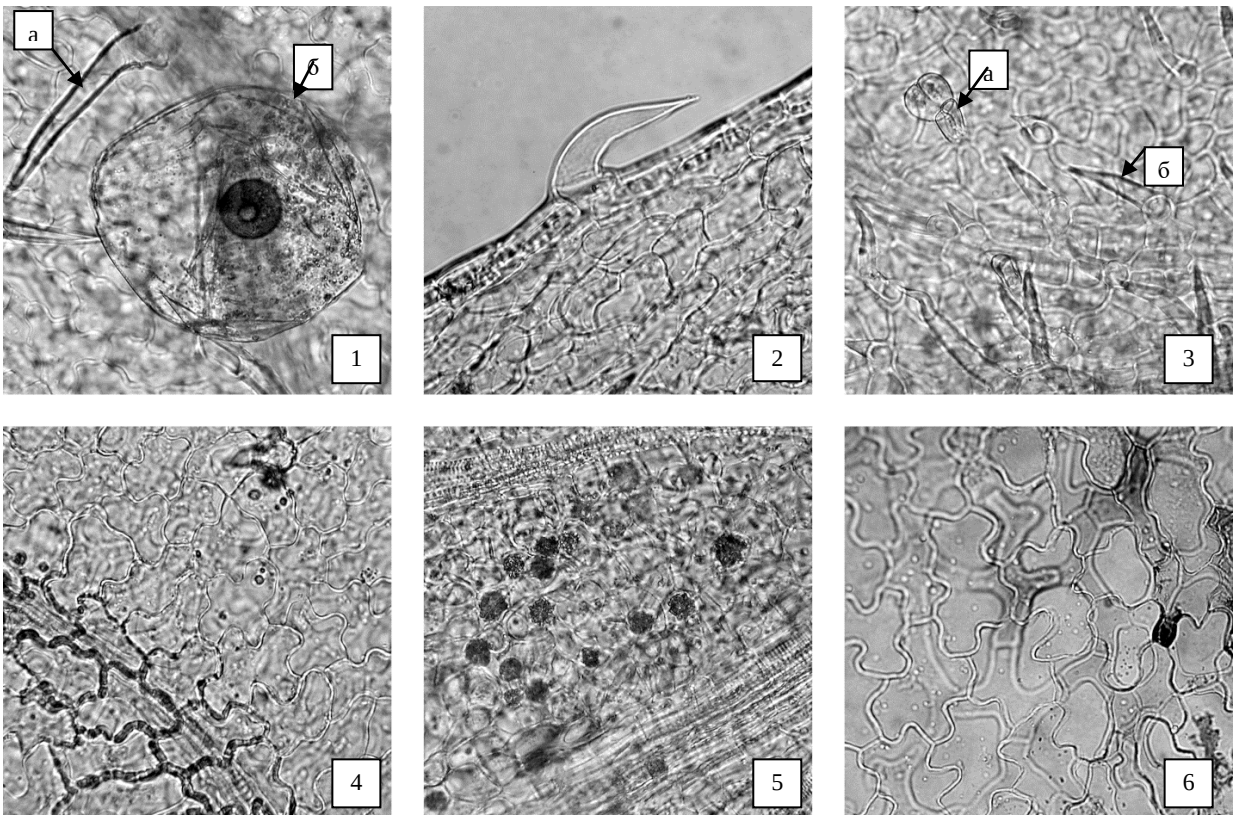


Рисунок – Хмеля обыкновенного соплодия.

1 – простой одноклеточный волосок (а) и железка (б) на нижнем эпидермисе (200×); 2 – простой одноклеточный волосок с расширенным основанием (200×); 3 – головчатый волосок (а) и одноклеточные тонкостенные волоски с заостренным концом (б) (200×); 4 – клетки верхнего эпидермиса с утолщенными извилистыми стенками вдоль жилки (200×); 5 – друзы оксалата кальция (200×); 6 – губчатая паренхима с крупными межклетниками (аэренхима) (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

1. Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

*Раствор стандартного образца (СО) рутина.*Около 0,005 г СО рутина растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности растворане более 3 мес при хранении в плотно укупоренной упаковке в защищенном от света месте.

Раствор СО гиперозида. Около 0,001 г СО гиперозида растворяют в 2 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности растворане более 3 мес при хранении в плотно укупоренной упаковке в прохладном, защищенном от света месте.

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со

слоем силикагеля наносят 30 мкл испытуемого раствора(см. раздел «Количественное определение. Сумма флавоноидов» приготовление раствора А испытуемого раствора) и параллельно в одну полосупо 1 мкл раствора СО рутина и раствора СО гиперозида.Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 60 мин смесью растворителей этилацетат–уксусная кислота ледяная–вода (5:1:1), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80–90% длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей. Затем пластинку выдерживают при 100–105 °С в течение 5–10 мин и теплую обрабатывают раствором для детектирования 1, сушат, а затем обрабатывают раствором для детектирования 2, после полного удаления следов растворителей пластинку просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме растворов СО рутина иСО гиперозида должна обнаруживаться зона адсорбции желтого или желто-зеленого цвета (рутин) и над ней зона адсорбции желтого или желто-зеленого цвета (гиперозид).

На хроматограмме испытуемого растворадолжны обнаруживаться (в порядке возрастания от линии старта) три зоны адсорбции с флуоресценцией желтого или желто-зеленого цвета – одна из них на уровне зоны адсорбции СО рутина, одна из них на уровне зоны адсорбции СО гиперозида и одна выше зоны адсорбции СО гиперозида, над этой зоной адсорбции зона адсорбции зеленого цвета; допускается обнаружение других зон адсорбции (флавоноиды).

2. Качественные реакции

К 1 мл испытуемого раствора(см. раздел «Количественное определение. Сумма флавоноидов» приготовление раствора А испытуемого раствора) прибавляют 1 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и нагревают на водяной бане в течение 2 мин; должно наблюдаться красное окрашивание (лейкоантоцианы).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье,измельченное сырье*– не более 13 %.

Зола общая. *Цельное сырье,измельченное сырье*– не более 14 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье,измельченное сырье* – не более 3 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Другие части растения (стебли, черешки и листья).*Цельное сырье,измельченное сырье* – не более 10 %.

Осыпавшиеся прицветные чешуи. *Цельное сырье*– не более 25 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье,измельченное сырье* – не более 1 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье,измельченное сырье*– не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье,измельченное сырье:* сумма флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 0,3 %; эфирного масла – не менее 0,2 %.

Сумма флавоноидов

Приготовление растворов.

Раствор СО рутина. Около 0,05 г (точная навеска) СО рутина (рутина тригидрата), предварительно высушенного при температуре 130–135 °С в течение 3 ч, растворяют в 85 мл спирта 96 % в мерной колбе вместимостью 100 мл при нагревании на водяной бане, охлаждают, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают (растворАСО рутина). Срок годности раствора не более 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

1,0 мл раствора А СО рутина, 2 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 % и 0,1 мл уксусной кислоты, доведенного спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл (раствор Б СО рутина).

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырьяпомещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 25 мл спирта 70 %, взвешивают с погрешностью ± 0,01 г, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане в течение 30 мин. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры и снова взвешивают, при необходимости доводят до первоначальноймассы спиртом 70 % и фильтруют через бумажный складчатый фильтр (раствор А испытуемого раствора).

1,0 мл раствора А испытуемого растворапомещаютв мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 % и 0,1 мл уксусной кислоты, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора). Оптическую плотность раствор Б испытуемого раствора измеряют через 40 мин на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из1,0 мл

раствора Аиспытуемого раствора и 0,1 мл уксусной кислоты, доведенный спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО рутина. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1,0 мл растворА СО рутина, 0,1 мл уксусной кислоты и доведенный спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете нарутиниабсолютно сухое сырье в процентах (*X*) и вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 25 \cdot 25 \cdot P \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot 100 \cdot 25 \cdot a \cdot 1 \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot a_0 \cdot P \cdot 25}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
A_o – оптическая плотность раствора Б СО рутина;
a – навеска сырья, г;
a_o – навеска СО рутина, г;
P – содержание основного вещества в СО рутина, %;
W – влажность сырья, %.

Допускается содержание суммы флавоноидов в пересчете нарутин вычислять с использованием удельного показателя поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридомпо формуле:

$$X = \frac{A \cdot 25 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\,\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 62500}{A_{1\,\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
$A_{1см}^{1\%}$ –удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при длине волны 410 нм, равный 260;
a – навеска сырья, г;
W – влажность сырья, %.

Определение содержания эфирного маслапроводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1 или 2, из 30,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм, время перегонки - 3,5 ч).

Примечания

1. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин определяют в сырье, предназначенном для получения водных, спиртовых, спирто-водных извлечений, экстрактов.

2. Содержание эфирного масла определяют в сырье, предназначенном для получения эфирного масла.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Чабреца трава **ФС.2.5.0047.15**

Thymi serpylli herba

Собранная в фазу цветения, высушенная и обмолоченная трава дикорастущего полукустарника тимьяна ползучего (чабреца) – *Thymus serpyllum* L., сем. яснотковых – *Lamiaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное (обмолоченное) сырье.* Смесь цельных или частично измельченных тонких стеблей, листьев и цветков. Стебли четырехгранные, тонкие, зеленовато - или желто-коричневого цвета, иногда с фиолетовым оттенком. Листья короткочерешковые, ланцетные, эллиптические или продолговато-эллиптические, длиной до 15 мм, голые или слабоопушенные с резко выступающими жилками на нижней стороне листа. При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) по всей поверхности листа видны многочисленные желтовато-коричневые точки (эфирномасличные железки), у основания листьев часто видны длинные щетинистые волоски.

Цветки мелкие, одиночные или собранные по нескольку штук в полумутовки. Каждый цветок состоит из двугубой чашечки и двугубого венчика. Чашечка длиной около 4 мм, венчик длиной 5-8 мм, тычинок – 4, пестик с четырехраздельной верхней завязью.

Цвет листьев – зеленый или серовато-зеленый; чашечки – красновато-коричневый; венчика – синевато-фиолетовый. Запах характерный. Вкус водного извлечения горьковато-пряный.

Измельченное сырье. Смесь кусочков тонких стеблей, листьев и

цветков, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки стеблей четырехгранные, тонкие, зеленовато - или желтовато-коричневого цвета, иногда с фиолетовым оттенком; листья зеленые или серовато-зеленые, цельные и в виде кусочков различной формы; на поверхности листьев видны желтовато-коричневые точки (эфирномасличные железки), у основания листьев часто видны крупные щетинистые волоски или их обломки; цветки мелкие, одиночные с двугубым венчиком синевато-фиолетового цвета (венчик иногда обесцвечивается) и двугубой красновато-коричневой чашечкой, часто измельчены.

Цвет зеленый, серовато-зеленый или зеленовато-коричневый с зеленовато-фиолетовыми, желтовато-коричневыми, коричневато-белыми, бледно-фиолетовыми, коричневато-фиолетовыми, синевато-фиолетовыми, красновато-коричневыми вкраплениями. Запах характерный. Вкус водного извлечения горьковато-пряный.

Порошок. Смесь кусочков стеблей, листьев, цветков, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки четырехгранных тонких стеблей голых или слегка опушенных, чаще в продольном сечении, желтовато-белые на изломе, снаружи – зеленовато-коричневые, красновато-коричневые или светло-коричневые, часто с фиолетовым оттенком; кусочки слабоопушенных листьев с многочисленными желтовато-коричневыми точками (эфирномасличные железки) светло-зеленого или зеленого цвета; на некоторых кусочках (по краю и у основания листа) видны редкие длинные щетинистые волоски; кусочки соцветий (чашечки или их части, опушенные с внешней стороны и по краю зубцов реснитчатыми волосками, иногда с заметными желтовато-коричневыми точками железок; лепестки венчика или их части, опушенные с внешней стороны) зеленого, коричневато-зеленого, красно-коричневого, розовато-фиолетового или синевато-фиолетового цвета.

Цвет порошка серовато-зеленый или коричневато-зеленый с желтовато-белыми, красно-коричневыми, светло-коричневыми, часто с фиолетовым оттенком, синевато-фиолетовыми, розово-фиолетовыми, зелеными и темно-зелеными вкраплениями. Запах характерный. Вкус водного извлечения горьковато-пряный.

Микроскопические признаки. *Цельное (обмолоченное), измельченное сырье.* При рассмотрении листа с поверхности должно быть видно, что клетки верхнего и нижнего эпидермиса с извилистыми боковыми стенками; на верхнем эпидермисе и по краю листа иногда заметна складчатость кутикулы и четковидное утолщение клеточных стенок. Устьица имеются на обеих сторонах листовой пластинки, на нижней стороне их значительно больше; устьица сопровождаются двумя околоустьичными клетками, смежные клетки которых расположены перпендикулярно устьичной щели (диацитный тип). Эфирномасличные железки крупные, состоят из 8 выделительных клеток, расположенных радиально; клетки эпидермиса вокруг места прикрепления железки часто образуют розетку. Волоски нескольких типов: очень крупные, многоклеточные, бородавчатые, расположенные у основания листа; выше по краю листовой пластинки встречаются более мелкие простые двух-, трехклеточные волоски с бородавчатой поверхностью; головчатые волоски очень мелкие с овальной одноклеточной головкой на короткой одноклеточной ножке, встречаются по всей поверхности листа; сосочковидные выросты эпидермиса, гладкие или слегка бородавчатые, чаще встречаются на верхней стороне и по краю листовой пластинки.

Клетки эпидермиса стебля прямоугольные, удлиненные, с прямыми или со скошенными концами, с четковидным утолщением клеточных стенок; устьица расположены в основном по ребрам. Эпидермис опушен простыми, коленчатоизогнутыми двух-, пятиклеточными волосками с бородавчатой кутикулой, головчатыми волосками с овальной одноклеточной головкой на короткой одноклеточной ножке, реже встречаются сосочковидные выросты

эпидермиса с гладкой или слегка бородавчатой кутикулой; встречаются эфирномасличные железки, состоящие из 8 выделительных клеток, расположенных радиально. На эпидермисе черешка располагаются сосочковидные выросты с гладкой или слегка бородавчатой кутикулой и многоклеточные волоски с бородавчатой кутикулой Клетки наружного и внутреннего эпидермиса листочков чашечки сильно извилистостенные; имеются волоски трех типов: простые, двух-, пятиклеточные с бородавчатой кутикулой, сосочковидные выросты эпидермиса с гладкой или слегка бородавчатой кутикулой, головчатые волоски с овальной одноклеточной головкой на короткой одноклеточной ножке.

Эпидермис трубки венчика прямостенный, с продольной складчатостью кутикулы с прямыми или со скошенными концами. В зеве и на отгибе венчика эпидермис извилистостенный, с сосочковидными выростами, опушен простыми и головчатыми волосками. Простые волоски двух-, четырех-, реже пятиклеточные с бородавчатой кутикулой. Головчатые волоски двух типов с овальной одноклеточной головкой на короткой одноклеточной ножке и с овальной одноклеточной головкой на двухклеточной ножке. На эпидермисе листочков чашечки и венчика встречаются крупные эфирномасличные железки, иногда с желто-коричневым содержимым, состоящие из 8 выделительных клеток, расположенных радиально; клетки эпидермиса вокруг места прикрепления железки иногда образуют розетку.

Порошок. При рассмотрении микропрепарата порошка должны быть видны клетки эпидермиса с извилистыми и утолщенными боковыми стенками; устьица с 2околоустьичными клетками, смежные стенки которых расположены перпендикулярно устьичной щели (диацитный тип). Округлые эфирномасличные железки состоят из 8 выделительных клеток, расположенных радиально, клетки эпидермиса вокруг места прикрепления часто образуют розетку. Простые волоски 3 типов: очень крупные многоклеточные бородавчатые волоски или их фрагменты; более мелкие 2-,

3-клеточные волоски с бородавчатой поверхностью, часто слегка согнутые в местах сочленения; сосочковидные выросты эпидермиса с гладкой или слегка бородавчатой поверхностью; головчатые волоски с овальной одноклеточной головкой на короткой одноклеточной ножке. На фрагментах стеблей и частях цветков видны точно такие же трихомы, как и на листьях, за исключением бородавчатых волосков: на цветках многоклеточные простые волоски имеют более тонкие оболочки и покрыты нежно-бородавчатой кутикулой; головчатые волоски 2 типов: на одноклеточной ножке с одноклеточной головкой и на 2-клеточной ножке с одноклеточной головкой.

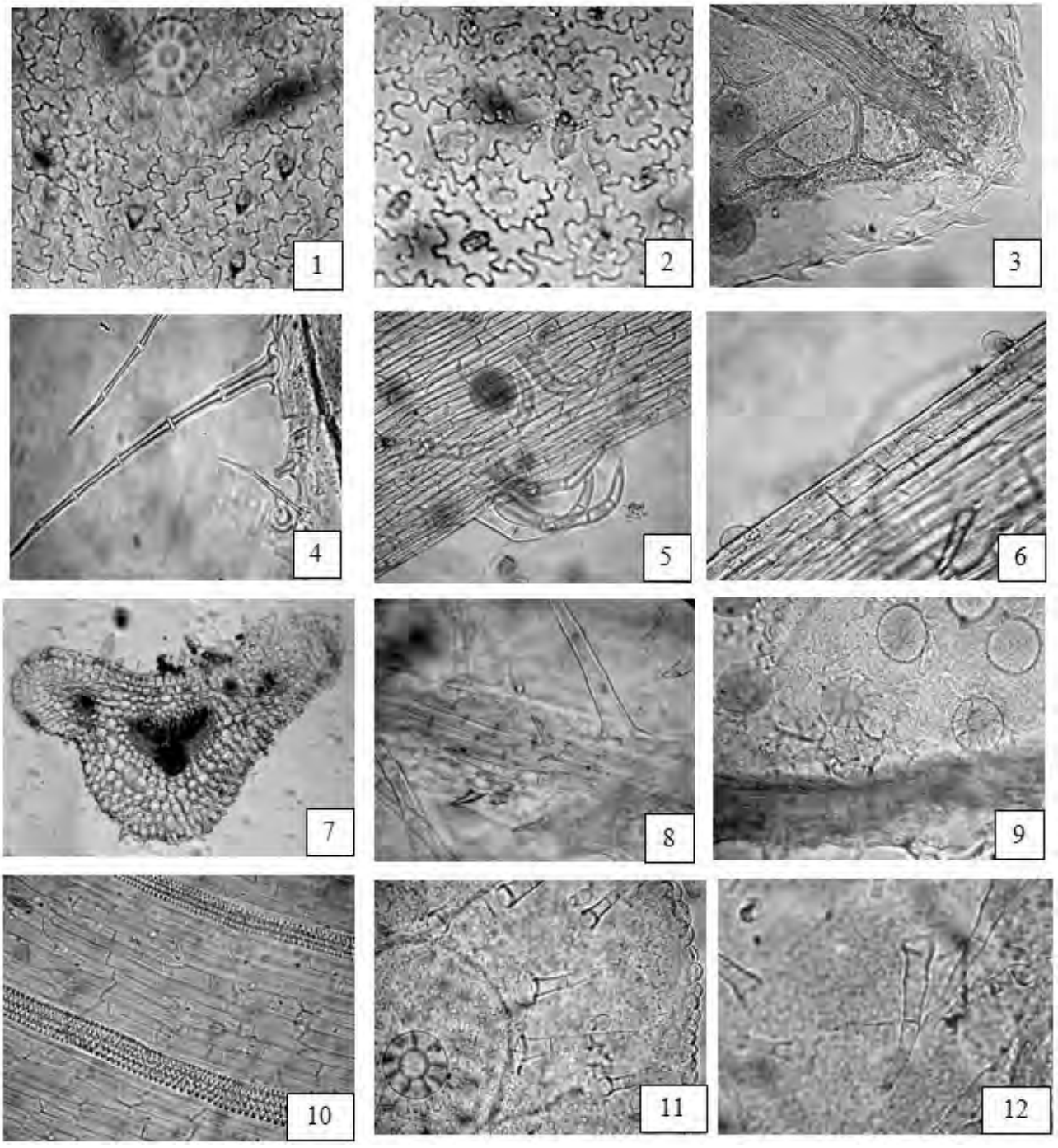


Рисунок – Чабреца трава.

1 – фрагмент верхнего эпидермиса листа с эфирномасличными железками (вид сверху), с сосочковидными выростами (300×), 2 – фрагмент нижнего эпидермиса листа с головчатым волоском, устьица диацитного типа (300×), 3 – фрагмент края листа с эфирномасличными железками (вид сверху), с сосочковидными выростами (300×), 4 – фрагмент края листа с многоклеточными бородавчатыми и 3-клеточными волосками (300×), 5 – фрагмент эпидермиса по стеблю с эфирномасличными железками (вид сверху), многоклеточными простыми волосками (300×), 6 – фрагмент эпидермиса по стеблю с головчатыми волосками (300×), 7 – поперечный срез

черешка листа (120×), 8 –фрагмент эпидермиса чашечки с многоклеточными простыми и головчатыми волосками, с сосочковидными выростами (300×), 9 – фрагмент эпидермиса чашечки с эфирномасличными железками (вид сверху) (300×), 10 –фрагмент эпидермиса трубки венчика (300×), 11 –фрагмент эпидермиса отгиба венчика с сосочковидными выростами, головчатыми и простыми многоклеточными волосками, эфирномасличными железками (вид сверху) (300×), 12 –фрагмент эпидермиса венчика с простыми многоклеточными и головчатыми волосками на 2-клеточной ножке (300×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Раствор стандартного образца (СО) лютеолин-7-О-глюкозида. Около 0,01 г СО лютеолин-7-О-глюкозида растворяют при нагревании в 10 мл спирта 70 %. Срок годности раствора 3 мес.

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 20 мкл испытуемого раствора (см. раздел «Количественное определение. Сумма флавоноидов» приготовление раствора А) и 5 мкл раствора СОлютеолин-7-О-глюкозида. Пластинку с нанесенными пробами сушат, помещают в камеру со смесью растворителей (без предварительного насыщения) этилацетат–муравьиная кислота безводная–вода (70:15:15)и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80–90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, обрабатывают алюминия хлорида спиртовым раствором 2 %, сушат и сразу просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме СО лютеолин-7-О-глюкозида должна обнаруживаться зона адсорбции желтого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией желтого цвета на уровне зоны адсорбции СО лютеолин-7-О-глюкозида и 3 зоны адсорбции желтого цвета ниже нее; допускается обнаружение других зон адсорбции (флавоноиды).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное (обмолоченное) сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 13 %.

Зола общая. *Цельное (обмолоченное) сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 12 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное (обмолоченное) сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 5 %.

Измельченность сырья. *Цельное (обмолоченное) сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.*Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Кусочки стеблей толщиной более 0,5 см. *Цельное (обмолоченное) сырье, измельченное сырье*– не более 10 %.

Органическая примесь. *Цельное (обмолоченное) сырье, измельченное сырье* – не более 1 %.

Минеральная примесь. *Цельное (обмолоченное) сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 1 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС

«Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное (обмолоченное) сырье, измельченное сырье, порошок:* суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-О-глюкозид – не менее 0,9 %; экстрактивных веществ, извлекаемых водой, – не менее 18 %; экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 30 %, – не менее 18 %.

Сумма флавоноидов

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл спирта 70% и взвешивают с погрешностью ± 0,01 г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на водяной бане в течение 60 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Затем колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и при необходимости доводят до первоначальной массы спиртом 70 %. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр, смоченный тем же спиртом, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А).

2,5 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл алюминия хлорида раствора 5 %в спирте70% и через 10 мин –1 мл уксусной кислоты раствора 3 %,доводят объем раствора тем же спиртом до метки, перемешивают и оставляют на 30 мин (раствор Б).

Оптическую плотность раствора Б измеряют через 30 мин на спектрофотометре при длине волны 396 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения раствор, состоящий из 2,5 мл раствора А, 1 мл уксусной кислоты раствора 3 %, доведенный спиртом 70 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-О-глюкозид и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\,см}^{1\%} \cdot a \cdot 2{,}5 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 100000}{A_{1\,см}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б;

$A_{1см}^{1\%}$ –удельный показатель поглощения лютеолин-7-О-глюкозидас алюминия хлоридом в спирте 70% при длине волны 396 нм, равный 345;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Определение экстрактивных веществ, извлекаемых водой, проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (навеска сырья –1,0 г, экстрагент – вода).

Определение экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 30%, проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (навеска сырья – 1,0 г, экстрагент – спирт 30 %).

Примечание. Определение суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-О-глюкозид проводят в сырье, предназначенном для производства лекарственных растительных препаратов (пачки, фильтр-пакеты); экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 30 % и водой, – в сырье, предназначенном для производства экстрактов.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Чага	**ФС.2.5.0103.18**
Inonotus obliquus	**Взамен ГФ XI вып. 2 ст. 63**

Собранные в течение всего года, освобожденные от остатков древесины, разрубленные на куски и высушенные наросты бесплодной формы трутовика косого (трутовика косотрубчатого) – чаги (березового гриба) *Inonotus obliquus* (Pers.) Pil., (*Fungus betulinus*) сем. Гименохетовых – *Hymenochaetaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Куски различной формы размером до 10 см. Наружный слой нароста черный, сильно растрескавшийся, средний - темно-коричневый с мелкими желтыми прожилками, число которых увеличивается к внутренней стороне. Ткань гриба плотная, твердая. Возможно присутствие пористого коричнево - желтого внутреннего слоя. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения горьковатый.

Измельченное сырье. Кусочки наростов различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет сырья от темно-коричневого до коричневого с желтыми вкраплениями. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения горьковатый.

Микроскопические признаки. *Цельное и измельченное сырье.* При рассмотрении поперечного и продольного среза должно быть обнаружено плотное переплетение гиф в наружном слое, в среднем и во внутреннем слое гифы расположены более рыхло. Трубчатый гименофор отсутствует. Во внутреннем слое возможно присутствие отверстий разного диаметра в диапазоне от 73 до 240 мкм, расположенных хаотично.

Примечание 1.

Для приготовления срезов сырьё предварительно замачивают в смеси спирт 96 % 1 часть: глицерин 1 часть в течение 3 - 7 суток.

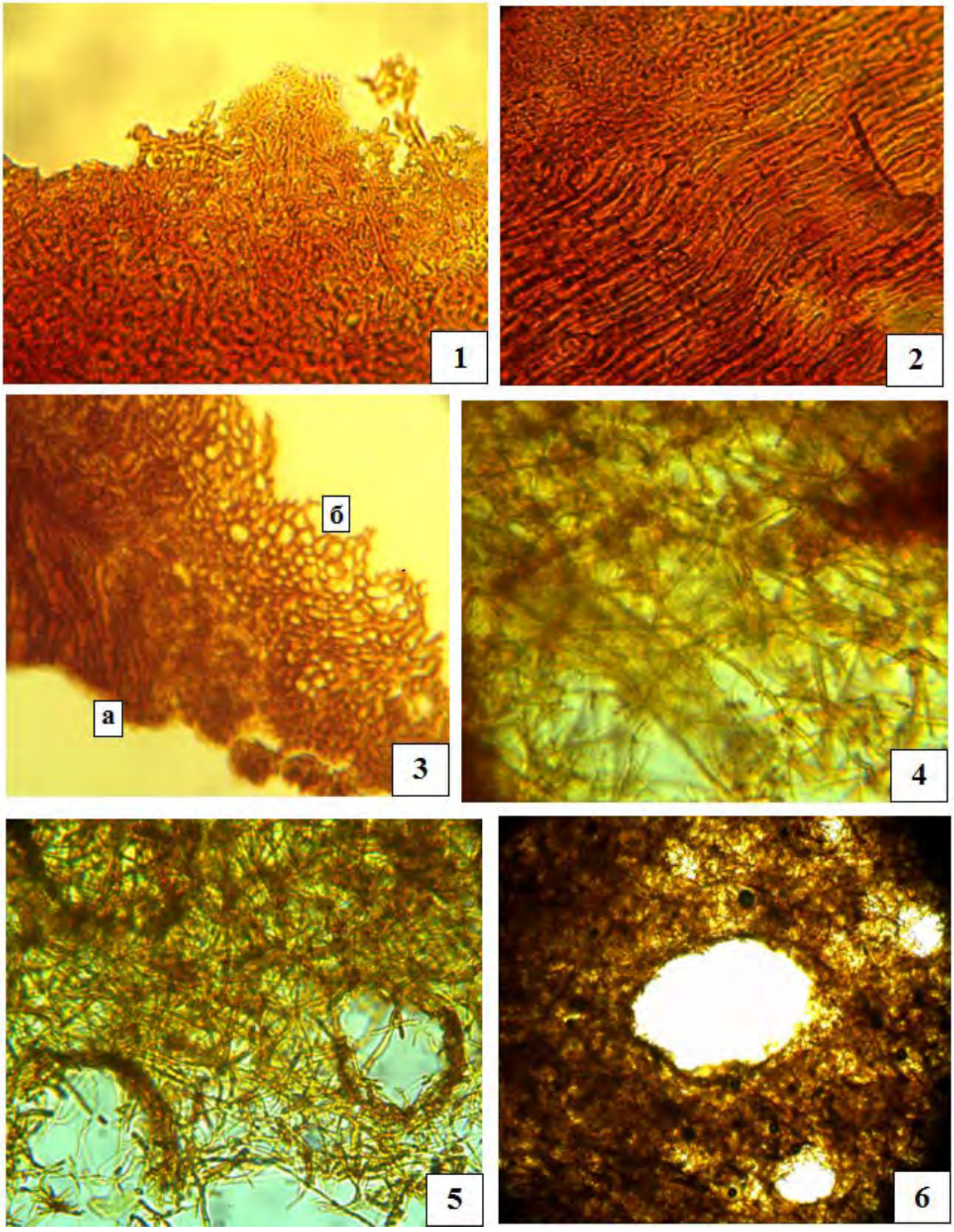


Рисунок 1 – Чага (цельное сырье)

1, 2, 3а – поперечный срез наружного слоя чаги:
плотное переплетение гиф (640×); 3б, 4 - поперечный срез внутреннего слоя чаги: гифы расположены рыхло (640×); 5 – поперечный срез

внутреннего слоя чаги: мицелий (640×); 6 – поперечный срез внутреннего слоя чаги: отверстия (640×).

Примечание 2.

К чаге возможны примеси трутовиков (т. настоящий и т. ложный). Они развивают плодовое тело, которое имеет копытообразную форму, размером от 12 до 40 см, сверху выпуклую, от светло-серой до тёмно-коричневой или черной окраски. Поверхность гладкая, концентрически-бороздчатая, покрыта твердой коркой, у трутовика ложного с возрастом часто растрескивающаяся. Нижняя сторона плодового тела плоская, бархатистая, содержит трубчатый гименофор, в котором образуются базидиоспоры. Гименофор на продольном срезе имеет вид продольных тяжей, состоящих из плотного переплетения гиф. На поперечном срезе гименофора имеются упорядоченно расположенные округлые поры размером от 128 до 148 мкм. В сырье, собранном в осенний период в гименофоре можно обнаружить базидии с базидиоспорами.

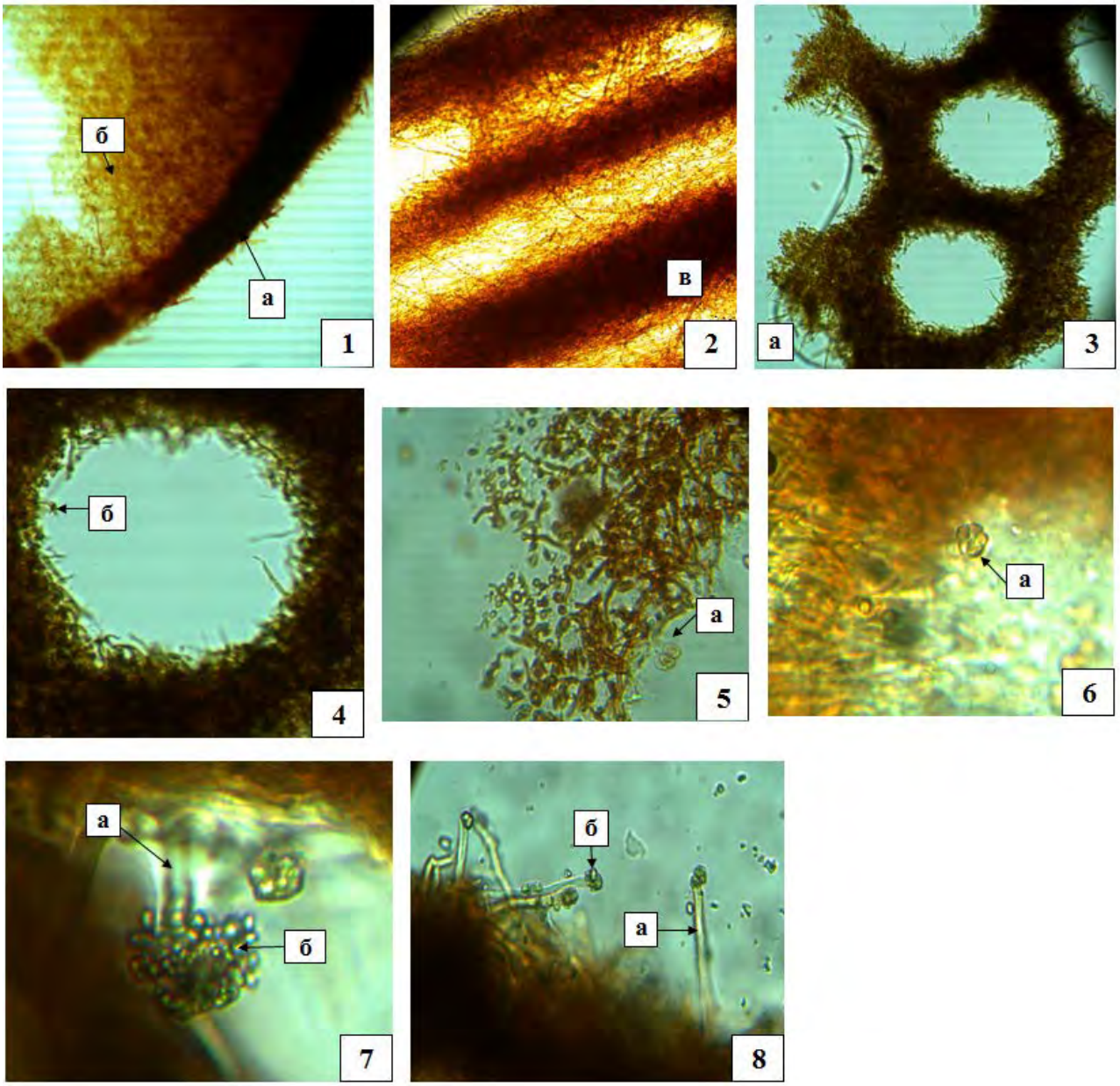


Рисунок 2 – Трутовика плодовое тело

1, 2 – продольный срез трутовика: а – наружный слой (плотное переплетение гиф), б – средний слой (гифы расположены рыхло), в - трубчатый гименофор (160×); 3, 4 –поперечный срез трутовика: а – поры трубчатого гименофора (160×), б – базидия с базидиоспорами (400×); 5, 6 – поперечный срез гименофора трутовика: а – базидия с базидиоспорами (400×); 7, 8 - фрагмент порошка трутовика: а – гифы, б – споры.

Определение основных групп биологически активных веществ.

Качественная реакция

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

Около 2,0 г измельченного сырья помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, добавляют 60 мл воды очищенной, оставляют на 1 ч при комнатной температуре, присоединяют колбу к обратному холодильнику и кипятят на электрической плитке в течение 2 ч, поддерживая слабое кипение. Водное извлечение фильтруют через бумажный фильтр в колбу и охлаждают. К фильтрату прибавляют 0,5 мл хлористоводородной кислоты концентрированной до pH 1,0 - 2,0 по универсальной индикаторной бумаге, перемешивают и оставляют на 30 мин. Должно наблюдаться образование обильного осадка темно-коричневого цвета (хромогенный комплекс).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 14 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 14 %.

Зола нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 2 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье*: частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм – не более 5 %.

Измельченное сырье: частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 4 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,2 мм – не более 10 %.

Посторонние примеси

Органическая примесь (в том числе примеси других трутовиков, бересты и остатков древесины**).** *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарствен-

ных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье:* содержание суммы фенольных соединений в пересчете на резорцин – не менее 0,1 %; содержание хромогенного комплекса – не менее 10 %; содержание экстрактивных веществ, извлекаемых водой не менее 20 %; содержание экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом этиловым 70 % – не менее 17 %.

Содержание суммы фенольных соединений в пересчете на резорцин

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм.

Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 30 мл хлороформа, присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на водяной бане до кипения и кипятят в течение 1 ч. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры, после этого извлечение фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. Фильтр со шротом снова помещают в колбу и указанным выше способом повторяют экстракцию еще 2 раза. Извлечения фильтруют в ту же мерную колбу, доводят объем раствора хлороформом до метки и перемешивают (испытуемый раствор).

Через 30 мин измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 275 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно хлороформа.

Содержание суммы фенольных соединений в пересчете на резорцин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 100}{A_{1см}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)}$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения резорцина в хлороформе при длине волны 275 нм, равный 179;
а – навеска сырья, г;
W – влажность сырья, %.

Содержание хромогенного комплекса

Около 5,0 г (точная навеска) сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 150,0 мл воды очищенной. Затем колбу соединяют с обратным холодильником и кипятят на плитке в течение 2 ч. После этого водное извлечение фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 250 мл, сырье переносят на фильтр и промывают водой. Водное извлечение охлаждают, доводят объем содержимого колбы до метки и тщательно перемешивают.

50,0 мл извлечения помещают в колбу вместимостью 100 мл, подкисляют 1,0 мл 25 % раствора хлористоводородной кислоты, перемешивают и оставляют на 30 мин. После чего содержимое колбы фильтруют через бумажный складчатый фильтр, предварительно высушенный и взвешенный до постоянной массы. Фильтр с осадком сушат на воздухе, затем при температуре 100 - 105 °С в течение 2 часов. Охлаждают в эксикаторе и взвешивают.

Содержание хромогенного комплекса в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 250 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot 50 \cdot (100 - W)} = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 50000}{a \cdot (100 - W)},$$

где m_1 – масса фильтра, г;

m_2 – масса фильтра с осадком, г;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Экстрактивные вещества. В соответствии с требованиями ОФС

«Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1, экстрагент – вода очищенная, экстрагент – спирт 70 %).

Примечание. Определение содержания хромогенного комплекса проводят для сырья, предназначенного для производства лекарственных растительных препаратов, расфасованных в пачки, «Бефунгин», «Чаги настойка»); суммы фенольных соединений в пересчете на резорцин – для сырья, предназначенного для производства настойки; экстрактивных веществ, извлекаемых водой очищенной – для сырья, предназначенного для производства препарата «Бефунгин»; определение экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 70 %, предназначенного для производства настойки.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Чемерицы Лобеля корневища с корнями **ФС.2.5.0104.18**

Veratri Lobeliani rhizomata cum radicibus **Взамен ГФ IX, ст. 418**

Собранные ранней весной или осенью, очищенные от земли, промытые и высушенные корневища с корнями дикорастущего, многолетнего травянистого растения чемерицы Лобеля – *Veratrum Lobelianum* Bernh., сем. лилейных – *Liliaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Корневища с многочисленными придаточными шнуровидными корнями, отходящими со всех сторон. Корневище вертикальное, одноглавое, реже многоглавое, продолговато коническое, толстое, цельное или продольно разрезанное. Длина корневища 2 – 8 см, толщина 1,5 – 3 см. Снаружи корневище серовато-коричневого или темно-коричневого цвета, на изломе – серовато-белого цвета. Излом гладкий или слегка зернистый. Корни цилиндрические, тонкие, длиной 10 – 20 см, толщиной 2 – 3 мм, продольноморщинистые, ямчатые, снаружи светло-желтого или желтовато-коричневого цвет, на изломе серовато-белого цвета. Излом гладкий или слегка зернистый.

Запах отсутствует. Вкус водного извлечения не определяется (сырье ядовито).

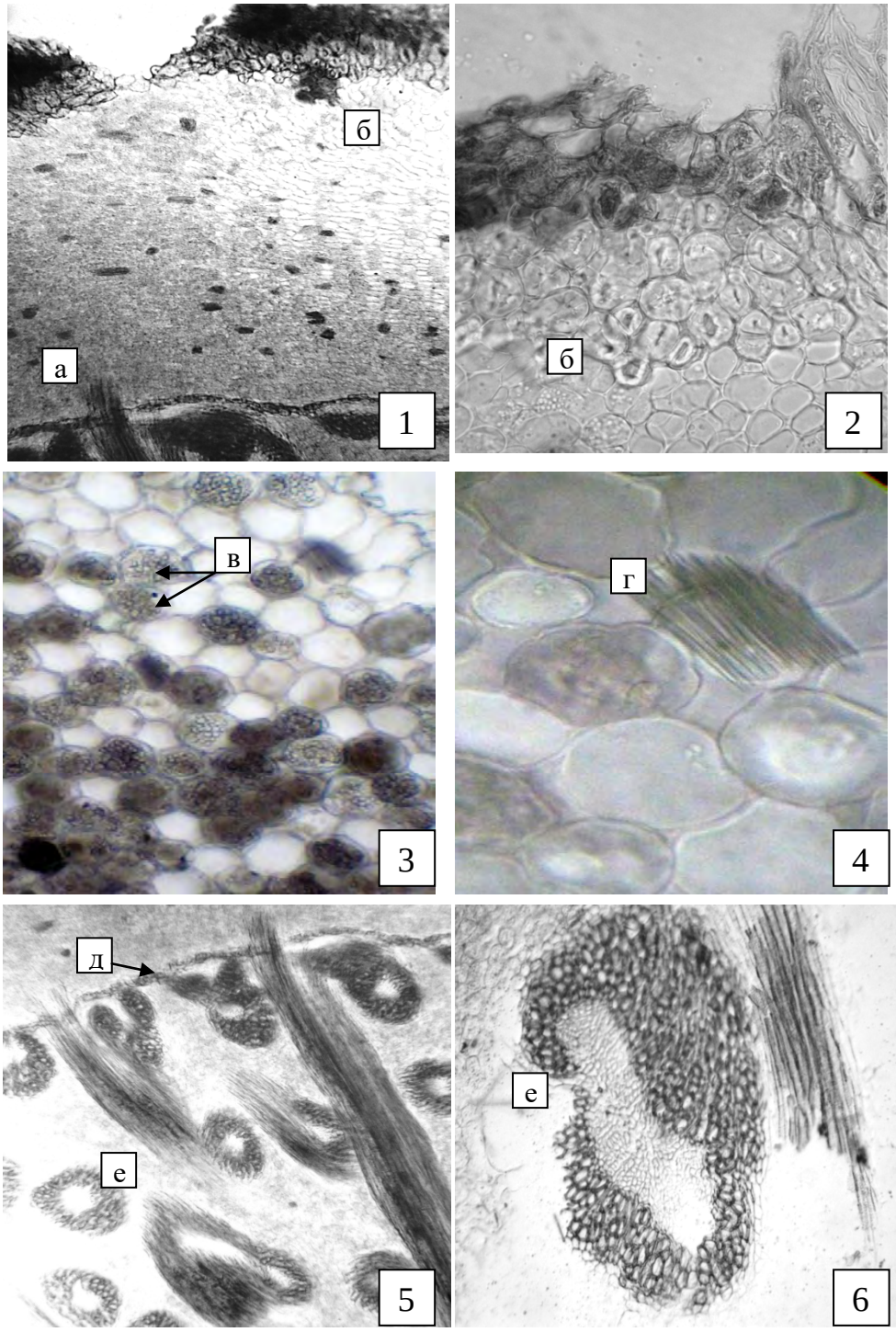
Измельченное сырье. Кусочки корневищ различной формы размером от 1 до 20 мм и кусочки корней различной формы размером от 1 до 8 мм.

Запах отсутствует. Вкус водного извлечения не определяется (сырье ядовито).

Микроскопические признаки. *Цельное сырье, измельченное сырье.* При рассмотрении поперечного среза корневища должно быть видно, что эпидермис отсутствует. Гиподерма состоит из многих рядов клеток желтого цвета, местами разорванных, имеющих характер паренхимы или колленхимы. Паренхима коры состоит из многих рядов клеток округло полигональной формы с небольшими межклеточными пространствами. Клетки паренхимы содержат крахмал, пучки рафид оксалата кальция. Простые крахмальные зерна округлой или овальной формы, с заметным центром наслоения или заменяющей его трещиной. Сложные крахмальные зерна состоят из 2 – 5 зерен. Эндодерма состоит из одного ряда подковообразно утолщенных клеток. В центральном осевом цилиндре проводящие пучки расположены беспорядочно, имеют различное строение: вблизи эндодермиса они коллатеральные, иногда неполноконцентрические, а в центре – центрофлоэмные, волокон не имеют.

На поперечном срезе корней снаружи должен быть виден эпидермис, состоящий из клеток с утолщенной наружной стенкой. За ним следует первичная кора, которая имеет очень рыхлую паренхиму, особенно в периферической части. Через один – два ряда от клеток эпидермиса, иногда непосредственно под ним, клетки коры образуют крупные, радиально вытянутые, неправильно вытянутой формы межклетники (аэренхима). Клетки паренхимы заполнены крахмальными зернами. Некоторые клетки содержат рафиды оксалата кальция. Эндодермис состоит из одного ряда подковообразно утолщенных клеток с пористыми стенками. Центральный осевой цилиндр состоит из 15 – 20 лучей древесины, между которыми находятся участки луба, состоящие из групп ситовидных трубок, окруженных лубяными волокнами.

Серная кислота концентрированная окрашивает срезы корневищ с корнями сначала в желто-оранжевый, а затем оранжево-красный цвета.


б
а
1
б
2
в
3
г
4
д
е
5
е
6

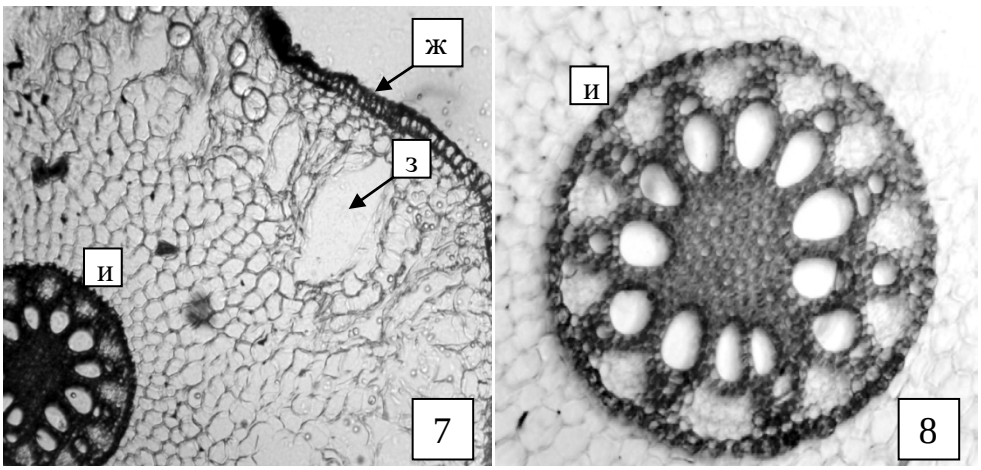


Рисунок 1 – Чемерицы Лобеля корневища с корнями: фрагменты поперечных срезов корневища: 1, 5, 7 – (56×); 2 – (280×); 3, 6 – (600×); 4 - (900×); фрагменты поперечных срезов корней: 7 - (56×), 8 - (135×): 1 (а) – гиподерма; 2 (б) – каменистые клетки; 3 (в) – клетки паренхимы с крахмальными зернами; 4 (г), 6 – рафиды оксалата кальция, 5 (д) – эндодерма; 5,6 (е) - проводящие пучки центрофлоэмные, 7 (ж) – эпидермис, 7 (з) - межклеточные пространства (аэренхима) в коре, 7,8 (и) - центральный осевой цилиндр.

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл спирта 70 % и взбалтывают в течение 2 ч, затем фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят в виде полос длиной 10 мм и шириной не более 2 мм 20 мкл (0,02 мл) испытуемого раствора. Пластинку с нанесенной пробой помещают в камеру (выложенную изнутри фильтровальной бумагой), предварительно насыщенную в течение не менее 60 мин смесью растворителей бутанол - уксусная кислота - вода (40:10:10) и хроматографируют восходящим способом.

Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться не менее 3 зон абсорбции темно-фиолетового цвета в средней части пластинки; допускается обнаружение других зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 14 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 10 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 4 %.

Измельченность сырья. *Измельченное сырье:* частиц корней размером свыше 20 мм и корневищ свыше 8 мм – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с размером отверстий 1 мм, - не более 15 %.

Посторонние примеси

Корневищ с остатками стеблей и листьев длиннее 1 см. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3 %.

Потемневших корневищ с корнями. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 5 %.

Органическая примесь*. Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 0,5 %.

Минеральная примесь*. Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье.* Суммы алкалоидов в пересчете на протоveратрин - не менее 1,0 %.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм. Около 6,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 200 мл, прибавляют 90,0 мл хлороформа, 2,5 мл аммиака раствора и 2,5 мл воды очищенной. Колбу закрывают пробкой и встряхивают с помощью шейкера в течение 30 мин и оставляют до разделения слоев. Хлороформный слой процеживают через вату. 45,0 мл хлороформного извлечения (соответствует 3,0 г порошка сырья), переносят в делительную воронку и извлекают последовательно 15 мл хлористоводородной кислоты раствора 1 % и 3 раза по 10 мл хлористоводородной кислоты раствором 1 %. Извлечения объединяют, фильтруют в другую делительную воронку, подщелачивают аммиака раствором и извлекают 20 мл хлороформа. Эту операцию повторяют несколько раз, используя каждый раз по 15 мл хлороформа до тех пор, пока небольшое количество хлорформного слоя после выпаривания и растворения остатка в хлористоводородной кислоте разведенной не перестанет давать с реактивом Майера положительную реакцию (осадок или муть).

Все хлороформные извлечения фильтруют через бумажный фильтр, содержащий 3-4 г натрия сульфата безводного свежепрокаленного, смоченного хлороформом в круглодонную колбу. Хлороформ отгоняют с помощью роторного испарителя при пониженном давлении досуха. Сухой остаток сушат при температуре 100 - 105 °С в течение 30 мин. После охлаждения сухой остаток растворяют в 10,0 мл 0,01 М раствора хлористоводородной кислоты, избыток которой титруют 0,01 М раствором натрия гидроксида (индикатор – метиловый оранжевый).

Содержание суммы алкалоидов в пересчете на протоveратрин в абсолютно сухом сырье в процентах (Х) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{0{,}0625 \cdot 90 \cdot (10 - V) \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot 45 \cdot (100 - W)},$$

где, V – объем 0,01 М раствора натрия гидроксида, пошедшего на титрование, мл;

0,0625 - количество суммы алкалоидов в пересчете на протоveратрин, соответствующее 1 мл 0,01 М раствора хлористоводородной кислоты;

a – навеска сырья, г;

45 – объем хлороформного извлечения, взятого для определения, мл;

W – влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Череды трехраздельной трава **ФС.2.5.0048.15**

Bidenti stripartitae herba

Собранная в фазы бутонизации и начала цветения и высушенная трава дикорастущего и культивируемого однолетнего травянистого растения череды трехраздельной – *Bidens tripartita* L., сем.астровых – *Asteraceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки*.Цельное сырье.* Цельные и частично измельченные олиственные стебли, листья и цветочные корзинки. Листья супротивные, на коротких, сросшихся основаниями черешках, срединные 3-, 5-раздельные, с ланцетовидными пальчатыми долями, верхушечные цельные, широколанцетные, длиной до 15 см, край неровно- и крупнозубчатый. Стебли округлоовальные, продольно-бороздчатые, толщиной до 0,8 см. Соцветия – корзинки диаметром 0,6–1,5 см. Наружные листочки обвертки в количестве 3–8, зеленые, удлиненно-ланцетовидные, коротко-заостренные, к основанию суженные, по краям шиповидно-реснитчатые, равные или в 2 раза превышающие по размеру корзинку. Внутренние листочки обвертки более короткие, удлиненно-овальные, по краю пленчатые, коричневато-желтые. Цветки мелкие, трубчатые. Семянки обратно-продолговато-яйцевидные, имеют 2 ости, наполовину короче семянок. Цвет листьев зеленый или коричневато-зеленый, стеблей – зеленый или зеленовато-фиолетовый, цветков – грязновато-желтый.

При рассматривании листьев под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видно, что верхняя сторона листа гладкая, а нижняя покрыта редкими волосками, край листа шиповатый (шипики до 1 мм). Стебель

мелкобороздчатый, покрыт редкими волосками. Внутренние листочки обвертки с широкой светло-желтой пленчатой каймой, центральная часть полосатая: черные полоски чередуются с желтыми. Прицветники сходны с ними, но более узкие и с широким перепончатым краем, по размеру равные цветкам, а при плодах – семянкам. Цветки трубчатые, желтые. Семянки и ости семянок покрыты вниз отстоящими щетинками. Между остями находятся остатки цветка.Запах слабый. Вкус водного извлечения горьковатый, слегка вяжущий.

Измельченное сырье. Смесь кусочков листьев, стеблей, бутонов, цветков и семянок, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Кусочки зеленых и коричневато-зеленых тонких листьев, кусочки плотных ребристых зеленых, коричневато-зеленых, реже зеленовато-фиолетовых стеблей с белой рыхлой сердцевиной, кусочки белой рыхлой сердцевины, кусочки корзинок, бутонов, семянок, отдельные цветки серо-желтого цвета. Запах слабый. Вкус водного извлечения горьковатый, слегка вяжущий.

Порошок. Смесь кусочков листьев, стеблей, бутонов, цветков и семянок различной формы, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Зеленые или коричневато-зеленые кусочки листовых пластинок, кусочки зеленых, коричневато-зеленых, реже зеленовато-фиолетовых стеблей с белой рыхлой сердцевиной, кусочки белой рыхлой сердцевины, кусочки бутонов, отдельные цветки серо-желтого цвета; редко - кусочки пленчатых листочков обвертки с темными полосками секреторных каналов, кусочки других частей соцветия, а также кусочки семянок. Запах слабый. Вкус водного извлечения горьковатый, слегка вяжущий.

Примечание. К другим видам череды, встречающимся в сырье как примесь, относятся:

1. *Череда лучистая (Bidensradiata Thuill.)*, имеет супротивные листья, желтовато-зеленые, на черешках, чаще 3-раздельные, реже цельные или 5-раздельные, с ланцетными или яйцевидно-ромбическими долями, конечная доля значительно крупнее боковых. При рассматривании под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны мелкобороздчатые, в верхней части редковолосистые, в нижней части – голые стебли. Верхняя и нижняя стороны листьев покрыты редкими крупными волосками, край листьев

шиповато-пильчатый (шипики до 1 мм). Цветочные корзинки 12–15мм, ширина их больше высоты. Цветки трубчатые обоеполые. Наружные листочки обвертки в числе 9–14, линейно-продолговатые или почти ланцетовидные, гладкие, по краям шиповидно-реснитчатые, превышающие иногда в 3 раза высоту корзинки; внутренние листочки –продолговатые, короче цветков с широкой желтой пленчатой каймой и хорошо заметными темными полосками млечников. Прицветники сходны с ними, но более узкие и с широким перепончатым краем, превышающие длину семянок. Семянки обратноклиновидные, с 2, реже 3 остями, которые немного короче или равны им, по краю обычно волнисто-бугорчатые с вниз направленными щетинками на ребрах и остях.

2. *Череда поникшая* (*Bidenscernua*L.), имеет супротивно расположенные листья, цельные, сидячие, ланцетные, на верхушке длиннозаостренные. При рассматривании под лупой (10×) или в стереомикроскоп (16×) видны мелкоборозд чатые, покрытые редкими волосками стебли. Верхняя и нижняя сторона листьев гладкая, светло-зеленая, край листа пиловидно-зубчатый. Цветочные корзинки 10–15мм, ширина их больше высоты. Цветки трубчатые, обоеполые. Встречаются краевые язычковые – бесполые. Наружные листочки обвертки в числе 5–9, линейно-продолговатые, гладкие, по краям шиповидно-ресничатые; внутренние продолговато-яйцевидные, почти равные цветкам с широкой желтой пленчатой каймой и хорошо заметными темными полосками млечников. Прицветники сходны с ними, но более узкие и с широким перепончатым краем, по размеру равные цветкам. Семянки обратноклиновидные, обычно с 2 остями, которые наполовину короче семянок. Между остями находятся остатки цветка. Ости и ребра семянки покрыты вниз отстоящими щетинками.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье, измельченное сырье.* При рассмотрении с поверхности эпидермиса листа должно быть видно, что клетки обеих сторон листовой пластинки извилистостенные. Устьицааномоцитного типа, на нижней стороне листовой пластинки устьиц больше (лист амфистоматический). По всей листовой пластинке встречаются волоски 2 типов. Первые – это гусеницеобразные волоски, состоящие из 9–18 клеток, с тонкими стенками. У основания волоска лежит крупная клетка вытянутой формы. Второй тип представлен простыми волосками с толстыми стенками, состоящими из 2–13 клеток с заостренной конечной клеткой.Они чаще встречается на нижней стороне листовой пластинки и по крупным жилкам. Иногда эти волоски могут быть заполнены коричневым

содержимым. В мезофилле листа вдоль жилок расположены секреторные ходы с коричневым или красновато-коричневым содержимым.

При рассмотрении с поверхности эпидермиса наружных (больших) и внутренних (маленьких) листочков обвертки отчетливо должны быть видны извилистостенные клетки, как с верхней, так и с нижней стороны листочков обвертки. С нижней стороны листочков, вдоль жилок, клетки эпидермиса более вытянутые. Устьица овальные, встречаются на нижней и верхней стороне листков обвертки, окружены 3–5 околоустьичными клетками (аномоцитный тип), с узкой устьичной щелью (амфистоматический лист). По всей поверхности и краю листочков встречаются волоски 2 типов: первые – это многоклеточные (6–12 клеток) гусеницеобразные, длинные с тонкими стенками, прилегают к поверхности листочка обвертки; вторые – многоклеточные (2–4 клеток) простые волоски с толстыми стенками. Оба вида волосков имеют сильно утолщенное многоклеточное основание. Второй тип волосков встречается гораздо чаще, чем первый. Также в мезофилле листочков вдоль жилок находятся секреторные ходы с коричневым или красновато-коричневым содержимым.

При рассмотрении лепестков венчика трубчатых цветков с поверхности должны быть видны слегка извилистые стенки клеток эпидермиса. Пыльца округло-многогранной формы. Поверхность пыльцы – шиповатая, без апертур.

Строение стебля и черешка одинаковое (диаметр черешка меньше диаметра стебля). На кусочках поперечного сечения стебля и черешка видно, что оба имеют пучковый тип строения.

Порошок. При рассмотрении препаратов порошка должны быть видны кусочки (в продольном сечении) стеблей, черешков, семянок; фрагменты листьев, прицветных листьев, листочков обвертки и цветков.

Фрагменты клеток эпидермиса с извилистыми стенками и аномоцитными устьицами. Встречаются остатки гусеницеобразных и толстостенных волосков с крупной клеткой вытянутой формы у основания,

иногда с коричневым содержимым внутри; фрагменты эпидермиса с секреторными ходами, заполненными коричневым содержимым. Должны быть видны фрагменты пленчатого прицветного листа со слегка извилистыми и четковидно-утолщенными клеточными стенками (простые поры). Встречаются остатки стебля и черешка. Видны кусочки эпидермиса лепестков венчика трубчатых цветков со спиральными сосудами и вкраплениями шиповатой пыльцы округло-многогранной формы. Встречаются кусочки семянок и их остей с остатками одноклеточных, толстостенных волосков.

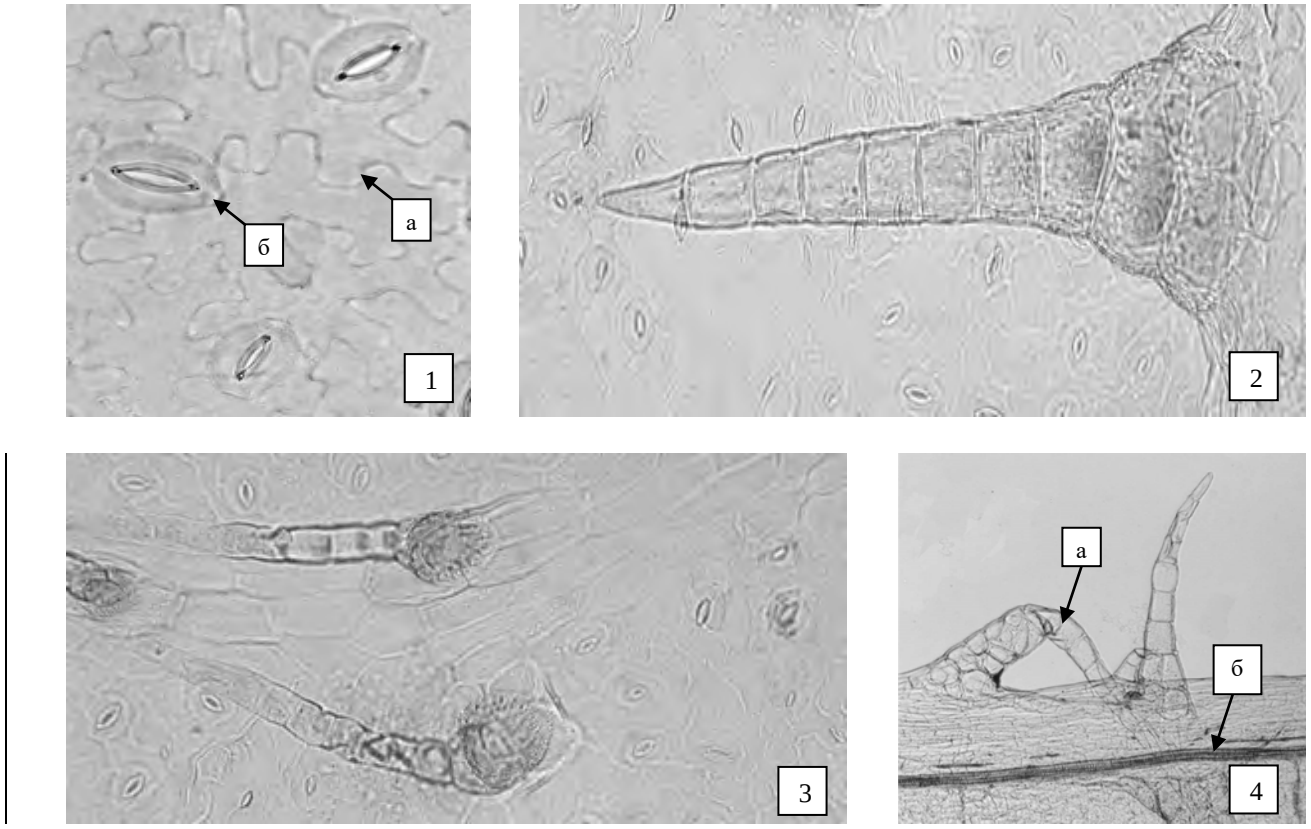


Рисунок – Череды трехраздельной трава.
1 – фрагмент эпидермиса: а – извилистые стенки эпидермиса, б– устьицааномоцитного типа (400×); 2 – толстостенный волосок (200×);3 – гусеницеобразные волоски (200×); 4 – фрагмент черешка: а –многоклеточные толстостенные волоски, б–секреторный ход вдоль жилки (40×)

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов

Раствора стандартного образца (СО) рутина. Около0,005 г рутина (рутина тригидрата) растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

*Раствора стандартного образца (СО) кверцетина.*Около 0,005 г кверцетинадигидрата или кверцетина растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около 1,0 гсырья, измельченногодо величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл спирта 96 %, нагревают с обратным холодильником на водяной бане в течение 10 мин. После охлаждения до комнатной температуры извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 30 мкл испытуемого раствора и параллельно в одну полосу по 5 мкл растворов СО рутина иСО кверцетина. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре в течение 5 мин, помещают в камеру, выложенную изнутри фильтровальной бумагой, предварительно насыщенную в течение не менее 30 мин, смесью растворителей этилацетат - муравьиная кислота безводная - вода (40:4:6) и хроматографируют восходящим способом.Когда фронт растворителей пройдет 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры и сушат до удаления следов растворителей. Далее пластинку нагревают в сушильном шкафу 2-3 мин при 100-105 °С и ещетеплуюобрабатывают последовательнодифенилборной кислоты аминоэтилового эфира раствором 1% в спирте96 % и макрогола 400 раствором спиртовым 5 %.Через 30 мин после обработки пластинку просматривают при дневном свете.

На хроматограмме растворов СО рутина и СО кверцетина должны обнаруживаться: зона адсорбции желтого, желто-оранжевого или оранжевого цвета(рутин), и над ней зона адсорбции желтого, желто-оранжевого или оранжевого цвета (кверцетин).

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться: две зоныадсорбции красного или фиолетово-красного цвета между зонами адсорбции рутина и кверцетина; зона адсорбции желтого цвета между вышеуказанными зонами красного или фиолетово-красного цвета; зона адсорбции желтого или розово-желтого цвета на уровне зоны адсорбции СО кверцетина; допускается обнаружение дополнительных зон адсорбции красного или фиолетово-красного цвета выше указанных. Не допускается обнаружение ярко-выраженной зоны адсорбции желтого цвета, расположенной над верхней обязательной зоной адсорбции красного или фиолетово-красного цвета (трава череды поникшей).

Хроматограмму просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме растворов СО рутина и СО кверцетина должны обнаруживаться: зона адсорбции желтого, желто-оранжевого или оранжевого цвета (рутин), и над ней зона адсорбции желтого, желто-оранжевого или оранжевого цвета (кверцетин).

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться: две зоны адсорбции с красно-коричневой флуоресценцией или нефлуоресцирующие (темные) между зонамиадсорбцииСО рутина и СО кверцетина; две зоныадсорбции с оранжево-желтой или розово-желтой флуоресценцией на уровне зоныадсорбции СО кверцетина и между вышеуказанными зонами с красно-коричневой флуоресценцией или нефлуоресцирующими (темными); две зоны адсорбции с голубой флуоресценцией между зонами адсорбции с оранжево-желтой или розово-желтой флуоресценцией. Не допускается обнаружение ярко-выраженной зоны адсорбции с оранжево-желтой флуоресценцией, расположенной над верхней зоной с красно-коричневой флуоресценцией или нефлуоресцирующей (темной) (трава череды поникшей); допускается обнаружение других зонадсорбции (флавоноиды).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок*– не более 13 %.

Зола общая. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* – не более 14 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* – не более 7 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %. *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм,– не более 5 %, частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Изменившие окраску части растения (потемневшие и почерневшие).*Цельное сырье,измельченное сырье* – не более 8 %.

Стебли, в том числе отделенные при анализе. *Цельное сырье*– не более 40 %.

Кусочки стеблей.*Измельченное сырье* – не более 40 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье,измельченное сырье* – не более 3 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок*– не более 1 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок:* сумма флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 0,5 %; сумма полисахаридов – не менее 3,5 %.

Сумма флавоноидов

Аналитическую пробу травы измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченной травы помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл спирта 70 %, колбу взвешивают с погрешностью ± 0,01 г, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане в течение 1 часа. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры и взвешивают, при необходимости доводят до первоначальной массы спиртом 96 %.Содержимое колбы фильтруют через бумажный складчатый фильтр, отбрасывая первые 25 мл фильтрата (раствор А).

1,0 мл раствора Апомещаютв мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 % и доводят раствор до метки спиртом 96 % (раствор Б). Через 40 минут измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 415 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1,0 мл раствора А и 0,1 мл уксусной кислоты, доведенный спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете нарутин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 25 \cdot 50 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 125000}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где A - оптическая плотность раствора Б;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при длине волны 415 нм, равный 260;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Полисахариды

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц,проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм. Около 10 г(точная навеска) измельченного сырья помещаютв колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл воды, колбу присоединяют к обратномухолодильнику и кипятят ее содержимое при перемешивании на электрической плитке в течение 30 мин. Экстракциюводой повторяют еще 4 раза по 100 мл в течение 30 мин каждый раз. Водные извлеченияцентрифугируют с частотой вращения 5000 об/мин в течение 10 мин и декантируют в мерную колбувместимостью 500 мл через 5 слоев марли, вложенной в стеклянную воронку диаметром 66 мм ипредварительно смоченной водой. Фильтр промывают водой и доводят объем раствора водой дометки (раствор А).

25,0 мл раствора А помещают в центрифужную пробирку, прибавляют 75 мл спирта 96 %,перемешивают, подогревают на водяной бане при температуре 60°С в течение 5 мин. Через 30мин содержимое центрифугируют соскоростью вращения 5000 об/мин в течение 30 мин.

Надосадочную жидкость фильтруют под вакуумом при остаточном давлении 13–16 кПа черезвысушенный до постоянной массы при температуре 100–105 °С стеклянный фильтр ПОР 16диаметром 40 мм. Затем осадок количественно переносят на тот же фильтр и промывают 15 мл смесиспирта 96 % и воды (3:1). Фильтр с осадком сушат сначала на воздухе, затем при температуре100-105 °С до постоянной массы.

Содержание суммы полисахаридов в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляютпо формуле:

$$X = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 500 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot 25 \cdot (100 - W)} = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 200000}{a \cdot (100 - W)},$$

где m_1–масса фильтра, г;

m_2–масса фильтра с осадком, г;

a– навеска сырья, г;

W– влажность сырья, %.

Примечание

Определение полисахаридов и флавоноидов проводят для сырья, предназначенного для производства лекарственных растительных препаратов (пачки, фильтр-пакеты).

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Черемухи обыкновенной плоды **ФС.2.5.0049.15**

Padi avii fructus

Собранные в период полного созревания и высушенные плоды многолетнего дикорастущего и культивируемого растения черёмухи обыкновенной – *Padus avium* Mill., сем. розоцветных – *Rosaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Плоды – костянки шарообразной или продолговато-яйцевидной формы, иногда к верхушке несколько заостренные, диаметром до 8 мм, морщинистые, без плодоножек, с округлым белым рубцом на месте отпадания плодоножки. Внутри плода содержится одна округлая или округлояйцевидная, очень плотная, светло-бурая косточка диаметром до 7 мм с одним семенем. Поверхность плодов морщинистая, косточки – поперечно-ребристая.

Цвет плодов черный, матовый, реже блестящий, иногда с беловато-серым или красноватым налетом на складках. Запах слабый. Вкус водного извлечения вяжущий.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* Эпидермис состоит из многоугольных прямостенных клеток. Кутикула прозрачная, хорошо отделяется от паренхимы. Устьица овальные, встречаются по всей поверхности плода, окружены 7 – 8 клетками эпидермиса (аномоцитный тип). Характерным диагностическим признаком является наличие скоплений клеток, заполненных бурым содержимым (цвет обусловлен накоплением антоцианов), окружающих устьичный аппарат. Клетки паренхимы тонкостенные, многоугольные, заполнены красным содержимым, плотно

прилегают друг к другу.

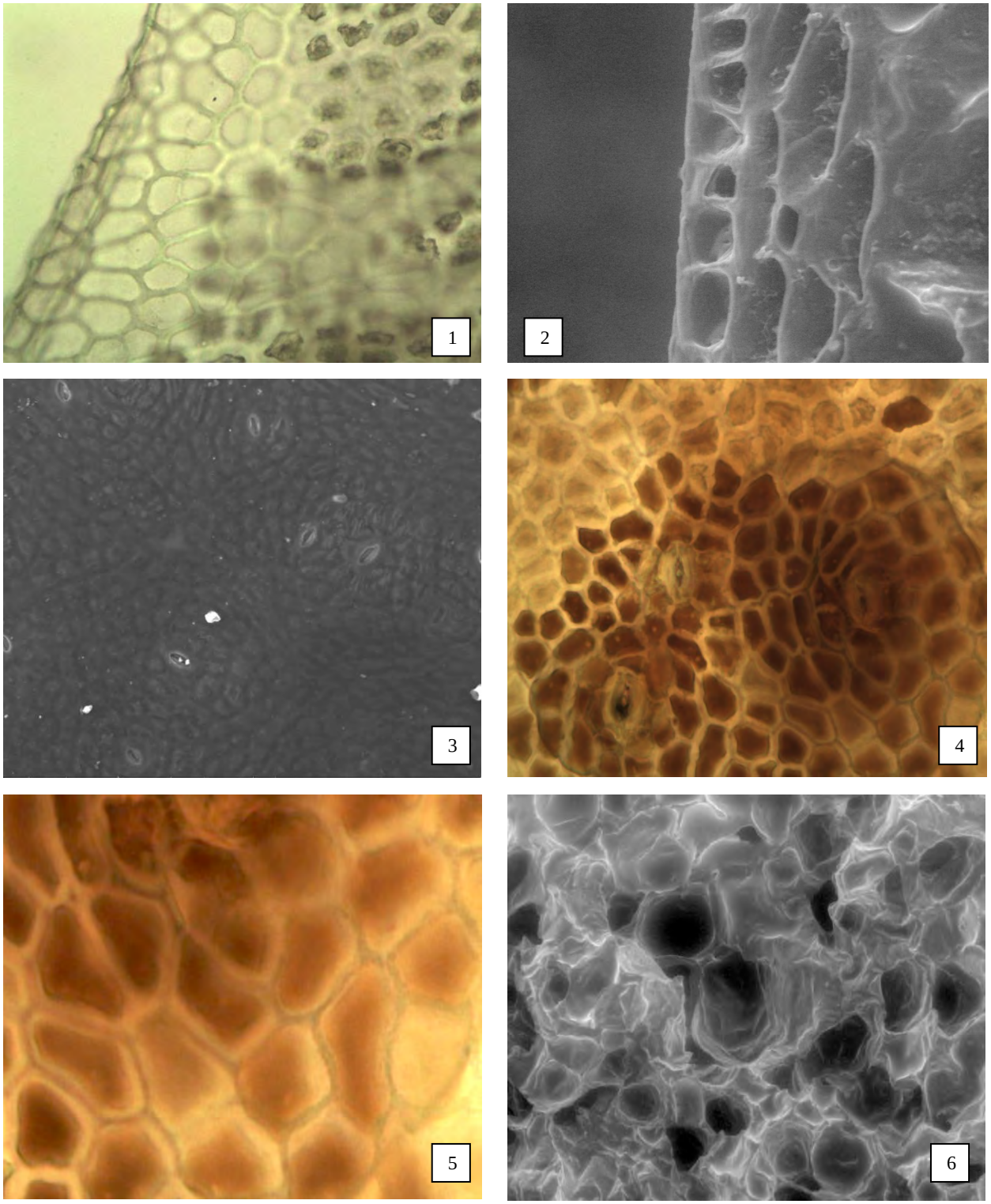


Рисунок – Черемухи обыкновенной плоды.
1 - эпидермис с многоугольными клетками с прямыми стенками (400×); 2 - клетки эпидермиса (вид сбоку) (500×); 3 - устьица аномоцитного типа (500×); 4 - скопление клеток, окружающих устьица и заполненных бурым

содержимым (800×); 5 - клетки паренхимы тонкостенные, многоугольные, плотно прилегающие друг к другу (500×); 6 - клетки паренхимы тонкостенные, многоугольные, плотно прилегающие друг к другу (1000×).

Определение основных групп биологически активных веществ

1. ***Тонкослойная хроматография***

Около 2,0 г сырья, измельчённого до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, помещают в круглодонную колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл хлористоводородной кислоты раствора 1 % в спирте 96 % и нагревают с обратным холодильником при температуре 50 °С на водяной бане в течение 60 мин. Полученное извлечение сливают. Раствор упаривают в вакууме до половины объёма (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 5 мкл полученного раствора. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 1 ч смесью растворителей этилацетат – уксусная кислота ледяная – муравьиная кислота безводная – вода (100:10:10:25), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдёт около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции красного цвета; допускается обнаружение других зон адсорбции.

При проявлении хроматограммы парами аммиака зона адсорбции синеет.

2. ***Качественные реакции***

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм. Около 1,0 г измельчённого сырья помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют

50 мл воды и нагревают на водяной бане в течение 30 мин, фильтруют через бумажный фильтр. К 2 мл водного извлечения прибавляют 1 мл железа(III) аммония сульфата раствора 1 % и перемешивают. Раствор при этом окрашивается в темно-зелёный цвет, а при стоянии выпадает темный, почти черный осадок (фенольные соединения).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье* – не более 14 %.

Зола общая. *Цельное сырье* – не более 5 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье* – не более 1 %.

Посторонние примеси

Плоды, пригоревшие и поврежденные насекомыми. *Цельное сырье* – не более 3 %.

Плоды, недозрелые и потемневшие. *Цельное сырье* – не более 3 %.

Другие части черемухи (плодоножки, в том числе отделенные при анализе, и веточки). *Цельное сырье* – не более 3 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье* – не более 1 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье* – не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье:* дубильных веществ в

пересчете на танин – не менее 1,7 %.

Определение дубильных веществ проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Черники обыкновенной плоды **ФС.2.5.0050.15**

Vaccinii myrtillifructus

Собранные зрелые и высушенные плоды дикорастущего и культивируемого многолетнего кустарника черники обыкновенной – *Vaccinium myrtillus* L., сем.вересковых – *Ericaceae.*

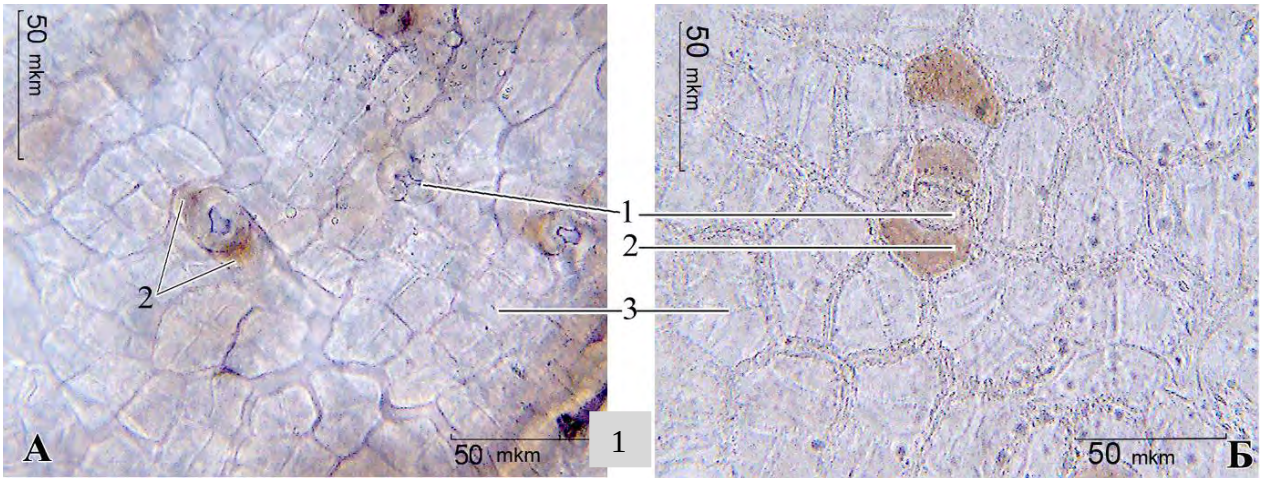
ПОДЛИННОСТЬ

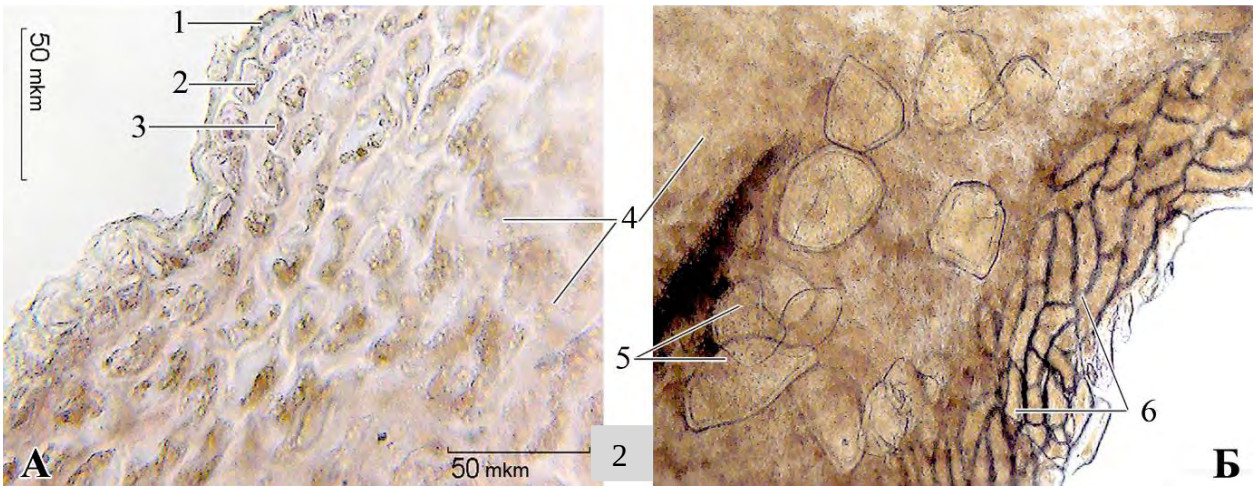
Внешние признаки.*Цельное сырье.*Плоды –ягоды диаметром 3–6 мм, бесформенные, сильно сморщенные, в размоченном виде шаровидные. На верхушке плодов виден остаток чашечки в виде небольшой кольцевой оторочки, окружающей вздутый диск с остатком столбика в центре или с небольшим углублением на месте его отпадания.В мякоти плода – многочисленные (до 30 штук) семена,коричневые, неясно-крупносетчатые, сжатые с боков и выпуклые по спинке. У основания плода иногда имеется короткая плодоножка.

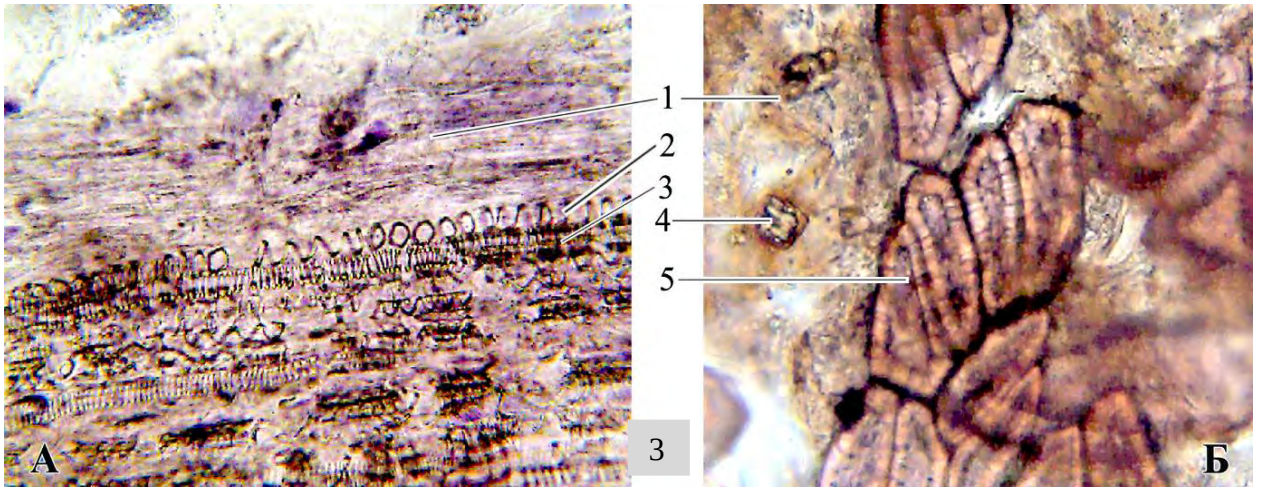
Цвет плодов с поверхности –черный с красноватым оттенком, матовый или слегка блестящий; мякоти – красно-фиолетовый; семян – красно-коричневый. Запах слабый. Вкус водного извлечения кисловато-вяжущий.

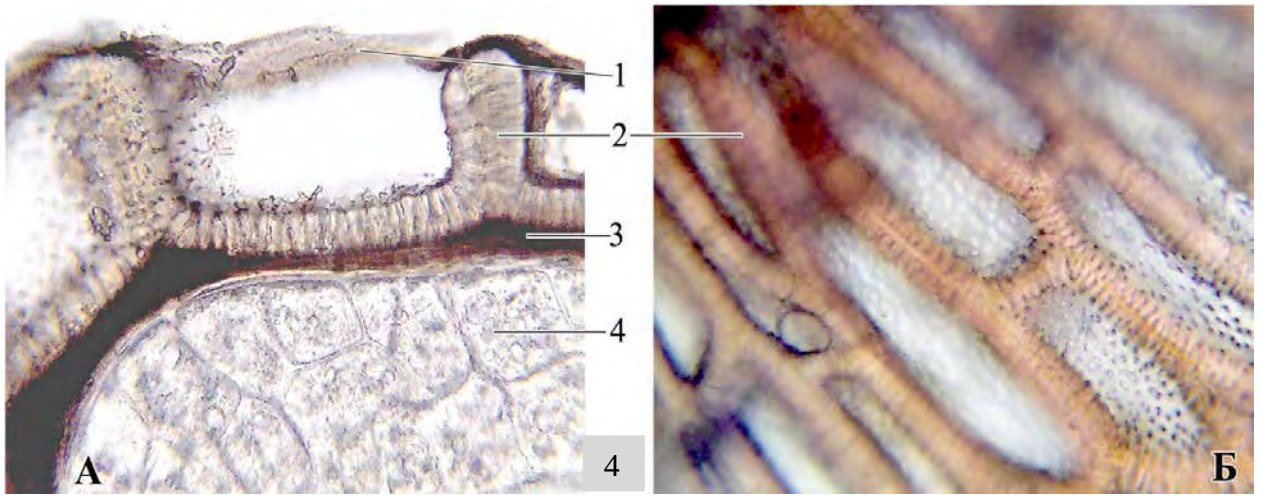
Микроскопические признаки.Клетки эпидермиса плодов сгруппированы и разграничены между собой более толстыми клеточными стенками (окончатого типа).Эпидермальные клетки и 2–3 ряда подстилающих клеток вытянуты в тангентальном направлении. Наружная стенка эпидермальных клеток утолщена сильнее остальных. Кутикула тонкая, покрыта восковым слоем. 2–3 ряда субэпидермальныхклеток имеют

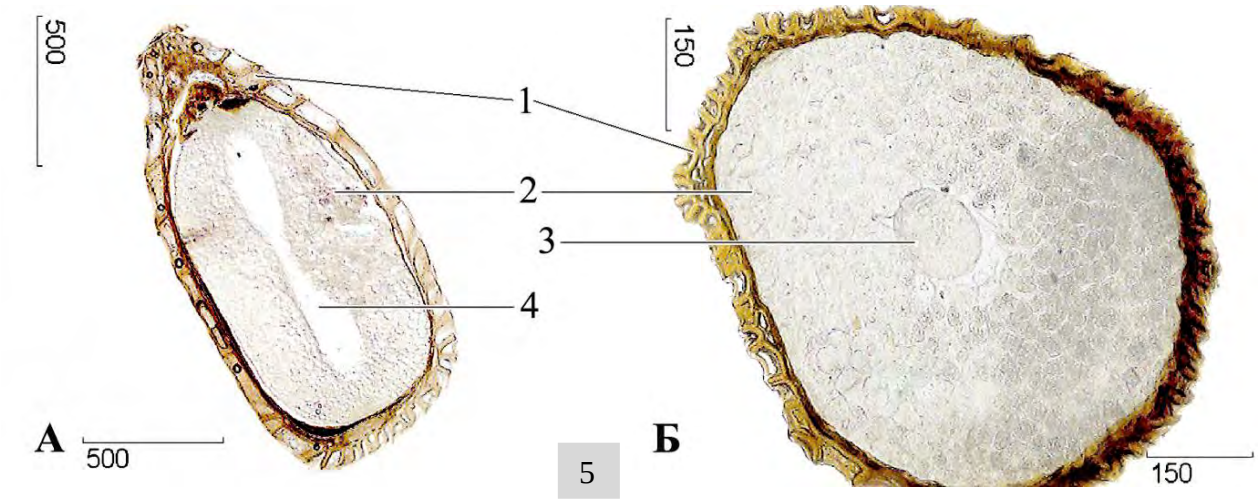
слабоколленхиматозный характер. К центру плода оболочки клеток становятся более тонкими.Устьица на зрелом плоде встречаются редко, обычно они деформированы. Эпидермис диска отличается от остальной поверхности плода более мелкими клетками и наличием хорошо сохранившихся устьиц. Устьица окружены 4–5 околоустьичными клетками (аномоцитного типа).Мезокарпийпредставлен рыхлой паренхимой, клетки которой окрашены антоцианами. Проводящие пучки очень тонкие, в основном представлены спиральными сосудами. Встречаются друзы оксалата кальция, которые преимущественно локализуются в эндокарпии.Эндокарпий состоит из большого числа толстостенных, полигональных, пористых клеток (склереид).Семена состоят из семенной кожуры, эндосперма, зародыша. Эпидермис семенной кожуры хорошо выражен, остальные клетки спадаются. Эпидермальные клетки вытянуты вдоль семени, внутренняя и боковая стенки склерефицированы, пронизаны порами. Ослизняется только наружная стенка эпидермальных клеток. Эндосперм мощный, зародыш небольшой. Клетки зародыша и эндосперма содержат алейроновые зерна и жирное масло.




1
2
3
4
5
6
50 mkm
50 mkm
А
Б
2


1
2
3
4
5
А
Б
3


1
2
3
4
А
Б
4



Рисунок–Черника обыкновенная плоды.
1 – эпидермис плодов: А – эпидермис диска; Б – эпидермис остальной части плода (1 – замыкающие клетки устьиц, 2 – околоустьичные клетки, 3 – клетки эпидермиса) (400×),
2 – фрагмент перикарпия(«давленный препарат) (А – фрагмент экзокарпия; Б – фрагмент эндокарпия. 1 – кутикула, 2 – клетки эпидермиса; 3 – колленхима, 4 – клетки мезокарпия,5 – брахисклереидымезокарпия, 6 – склереидыэндокарпия) (400×),
3 – фрагмент перикарпия (А – мезокарпий плода. Сосудистые пучки. Б – фрагмент эндокарпия (1 – клетки паренхимы мезокарпия, 2 – кольчатые сосуды; 3 – спиральные сосуды, 4 – толстостенные клетки (склереиды); 5 – друзы оксалата кальция) (400×),
4 – семенная кожура (А – продольный срез; Б – эпидермис с поверхности (1 – ослизняющиеся стенки эпидермальных клеток семени; 2 – кожура семени; 3 – спавшаяся паренхима семенной кожуры;4 – эндосперм) (400×);
5 – семя. Зародыш (А–продольный срез(40×); Б – поперечный срез (100×) (1 – семенная кожура, 2 – эндосперм, 3 – зародыш, 4 – место локализации зародыша (на продольном срезе семени).

Определение основных групп биологически активных веществ

1. ***Тонкослойная хроматография***

Около 2,0 гсырья помещают в коническую колбу со шлифом, прибавляют 10 мл хлористоводородной кислоты раствора 1% в спирте 96%, закрывают пробкой и перемешивают в течение 30 мин. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию стартааналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 20 мкл испытуемого раствора. Пластинку с нанесенной пробой сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно

насыщеннуюв течение 5 ч смесью растворителей бутанол–уксусная кислоталедяная –вода (4:1:2), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80–90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться зона адсорбции фиолетового цвета и выше нее зона адсорбции розового цвета; допускается обнаружение других зон адсорбции (антоцианы).

2. ***Качественные реакции***

При прибавлении к отвару 2 капель железа(III) аммония сульфата раствора10 %образуется черно-зеленое окрашивание (дубильные вещества).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье* – не более 14 %.

Зола общая.*Цельное сырье*–не более 3 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте.*Цельное сырье* –не более 0,8 %.

Посторонние примеси

Другие части растения (листья, кусочки стеблей).*Цельное сырье* – не более 0,25 %.

Плоды, недозрелые, твердые и пригоревшие.*Цельное сырье* – не более 1 %.

Органическая примесь.*Цельное сырье* – не более 2 %.

Минеральная примесь.*Цельное сырье* – не более 0,3%.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями

ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье:*сумма антоцианов в пересчете на цианидин-3-гликозид– не менее 0,5 %.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером3 мм.Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбусо шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл спирта 60 %, содержащего хлористоводородной кислоты 1 %. Колбу закрывают пробкой и взвешивают с точностью до ± 0,01 г, затем присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане в течение 60 мин,затем охлаждают до комнатной температуры, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент спиртом 60 %, содержащим хлористоводородной кислоты 1 %. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр (раствор А).

1,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 96 %, содержащим хлористоводородную кислоту 1 %, до метки и перемешивают (раствор Б).

Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре при длине волны 546 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл спирта 60%, доведенный спиртом 96 %содержащим хлористоводородной кислоты 1 %до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3-О-гликозид в абсолютно сухом сырье в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 125000}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)}$$

гдеA– оптическая плотность раствора Б;

$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения цианидин-3-О-гликозида при длине волны 546 нм, равный 600;

a– навеска сырья, г;

W – влажность, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Чистотела большого трава	**ФС.2.5.0105.18**
Chelidonii majoris herba	**Взамен ГФ XI вып. 2 ст. 47**

Собранная в фазу цветения высушенная трава дикорастущего и культивируемого многолетнего травянистого растения чистотела большого – *Chelidonium majus* L., сем. маковых – *Papaveraceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Цельные или частично измельченные олиственные стебли с цветками и плодами разной степени развития, кусочки стеблей, листья, цветки и плоды. Стебли слегка ребристые, иногда ветвистые, в междоузлиях полые, слабоопушенные, длиной до 50 см. Листья очередные, черешковые, в очертании широкоэллиптические, пластинки непарноперисторассеченные с 3 – 4 парами городчатолопастых сегментов. Бутоны обратнояйцевидные с двумя опушенными чашелистиками. Цветки по 4 – 8 в пазушных зонтиковидных соцветиях на цветоносах, удлиняющихся в период плодоношения. Венчик из 4 обратнояйцевидных лепестков, тычинок много. Плод – продолговатая, стручковидная, двустворчатая коробочка. Семена многочисленные, мелкие, яйцевидные с ямчатой поверхностью (под лупой), с мясистым белым придатком.

Цвет стеблей светло-зеленый, листьев зеленый, с другой – серовато-зеленый, венчика – ярко-желтый, плодов – серовато-зеленый, семян – от темно-коричневого до черного.

Запах характерный. Вкус водного извлечения не определяется (сырье ядовито).

Измельченное сырье. Смесь кусочков листьев, стеблей, цветков, плодов различной формы, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.

При просмотре под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) должны быть видны: кусочки листьев зеленого цвета с верхней стороны, светло-зеленого, серовато-зеленого цвета с нижней стороны; также встречаются кусочки стеблей - слегка ребристые, зеленого, светло-зеленого цвета; фрагменты лепестков - желтого или темно-желтого цвета; кусочки створок плодов – серовато-зеленого или коричневого цвета; семена – от темно-коричневого до черного цвета, мелкие, яйцевидные с ямчатой поверхностью.

Цвет серовато-зеленый с желтыми вкраплениями.

Запах характерный. Вкус водного извлечения не определяется (сырье ядовито).

Порошок. Кусочки листьев, стеблей, цветков, плодов и семян различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

При просмотре под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны: кусочки листьев коричневато-зеленого, зеленого, светло-зеленого, зеленовато-серого цвета; кусочки стеблей – светло-зеленого, зеленоватого должны быть цвета; фрагменты лепестков желтого или темно-желтого цвета; кусочки створок плодов серовато-зеленого или коричневого цвета; семена от темно-коричневого до черного цвета, мелкие, яйцевидные с ямчатой поверхностью.

Цвет серовато-зеленый с желтыми вкраплениями, реже – с беловатыми вкраплениями.

Запах характерный. Вкус водного извлечения не определяется (сырье ядовито).

Микроскопические признаки. *Цельное, измельченное сырье.* При рассмотрении микропрепарата листа с поверхности должны быть видны клетки эпидермиса с извилистыми стенками. Устьица только на нижней стороне листа с 4 – 7 околоустьичными клетками (аномоцитный тип). На нижней стороне листа по жилкам встречаются редкие, длинные простые волоски с тонкими стенками, часто оборванные, состоящие из 7 – 20 клеток, иногда перекрученные или с отдельными спавшимися члениками. На верхушках городчатых зубцов при схождении жилок расположена гидатода с

сосочковидным эпидермисом и 2 – 5 крупными водяными устьицами. Клетки губчатой паренхимы с крупными межклетниками (аэренхима) и с крупными водяными устьицами. Жилки сопровождаются млечными трубками с темно-коричневым зернистым содержимым (после кипячения в щелочи).

При рассмотрении микропрепаратов лепестков с поверхности должны быть видны продольно вытянутые клетки эпидермиса с желто-коричневым содержимым, имеющие с наружной и внутренней стороны прямые или слабо извилистые стенки. В мезофилле лепестка вдоль сосудов встречаются призматические кристаллы оксалата кальция.

Клетки эпидермиса чашелистиков и цветоножек продольно вытянутые и имеют прямые или слабо извилистые стенки. Устьица аномоцитного типа, крупные, расположенные на чашелистиках с наружной стороны. На поверхности чашелистиков и цветоножек имеются многочисленные длинные простые волоски, характерные для сырья чистотела, и их фрагменты. В основания чашелистиков жилки сопровождаются млечными трубками с темно-коричневым зернистым содержимым. Пыльца округлая, шиповатая.

При рассмотрении «давленого» микропрепарата стебля должны быть видны продольно вытянутые клетки эпидермиса с прямыми стенками, устьица аномоцитного типа, на поверхности встречаются редкие, длинные простые волоски с тонкими стенками, часто оборванные. Паренхима характеризуется клетками вытянутой формы, наличием крахмальных зерен, механических волокон, сосудов спирального, лестничного, сетчатого и кольчатого типа.

Порошок. При рассмотрении микропрепарата должны быть видны фрагменты клеток эпидермиса листа с извилистыми стенками. На фрагментах нижней стороны листа и наружной стороне чашелистиков обнаруживаются устьица аномоцитного типа. Во фрагментах эпидермиса лепестков имеется желто-коричневое содержимое. На некоторых фрагментах нижней стороны листа и чашелистиков встречаются редкие, длинные простые волоски с тонкими стенками, часто оборванные, состоящие из 7 – 20 клеток, иногда перекрученные или с отдельными спавшимися члениками, и их фрагменты.

Фрагменты клеток губчатой паренхимы с крупными межклетниками (аэренхима). В мезофилле фрагментов встречаются млечные трубки вдоль жилок.

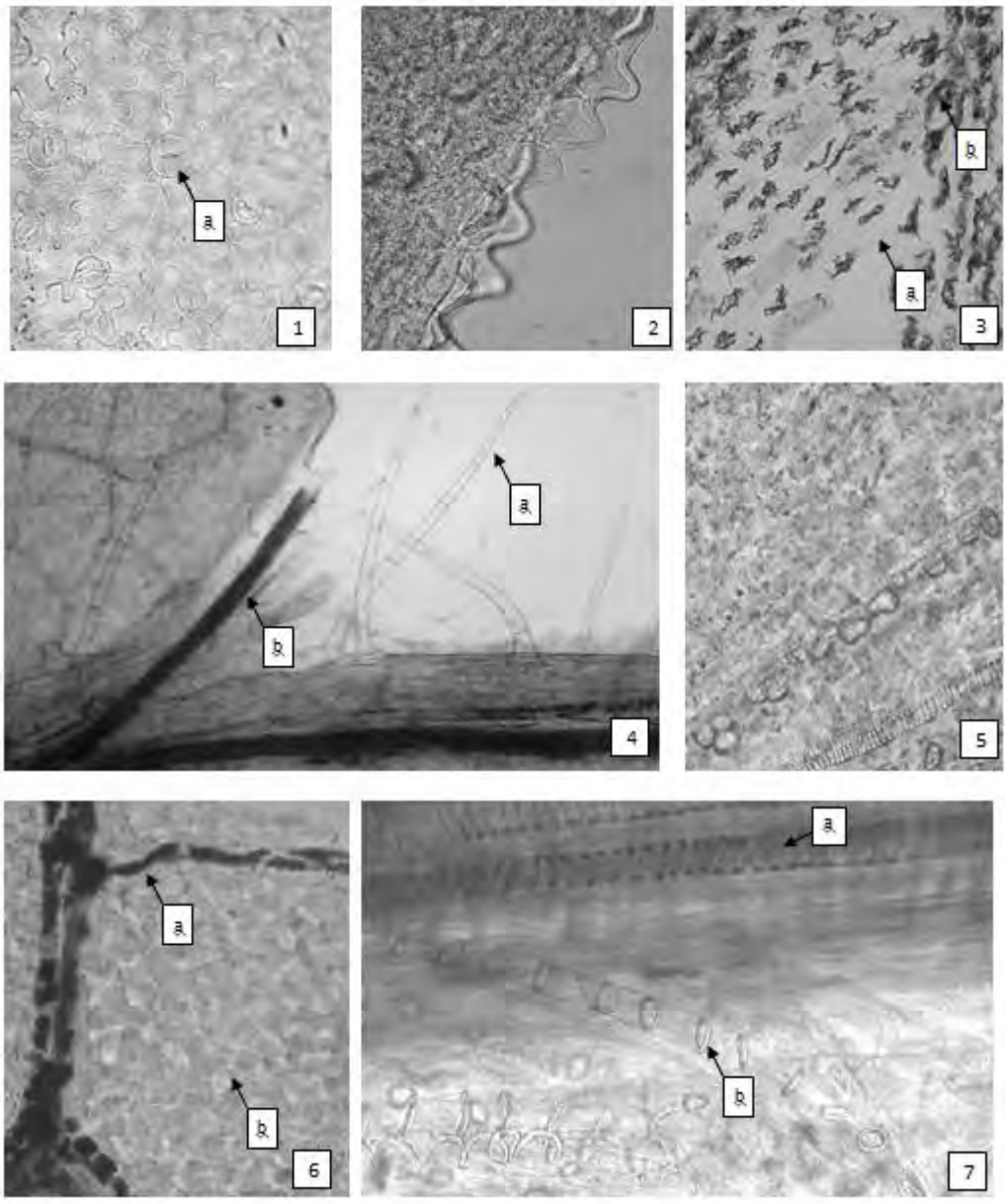


Рисунок – Чистотела большого трава
1 – фрагмент эпидермиса листа (нижняя сторона): a – устьице аномоцитного типа (200×); 2 – сосочковидный эпидермис верхушки городчатого зубчика листа (200×); 3 – фрагмент лепестка: a – клетки эпидермиса с прямыми стенками, b – желто-коричневое содержимое (200×); 4 – фрагмент эпидермиса листа с многоклеточными волосками (a) и млечные трубки с темно-коричневым зернистым содержимым (b) (40×); 5 – фрагмент лепестка: призматические кристаллы оксалата кальция, расположенные вдоль сосудов (400×); 6 – фрагмент листа: a – млечные трубки с темно-коричневым зернистым содержимым, b – клетки губчатой паренхимы с крупными межклетни-

ками (аэренхима) (200×); 7 – фрагмент стебля: a – сосуды спирального типа, b – сосуды кольчатого типа (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Качественная реакция

Измельченное сырье или порошок равномерно рассыпают на листе черного цвета и рассматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм. На изломах черешков листьев и внутренней поверхности стеблей должна наблюдаться флуоресценция желтого или зеленовато-желтого цвета (алкалоиды: хелидонин, берберин, коптизин и др.). Поверхность листьев и стеблей имеет флуоресценцию сине-голубого цвета, обусловленную наличием кутикулы.

Около 1,0 г измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 1 мл раствора аммиака 10 %, хорошо перемешивают, прибавляют 10 мл дихлорэтана, настаивают в течение 10 мин при периодическом взбалтывании в закрытой колбе и фильтруют через бумажный фильтр.

5 мл фильтрата помещают в пробирку с притертой пробкой, прибавляют 1 мл серной кислоты раствора 10 % и взбалтывают в течение 3 мин; должен образовываться раствор с осадком оранжевого цвета (сангвинарина и хелеритрина бисульфаты).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 14 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 15 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 2 %.

Измельченность сырья. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; частиц, проходя-

щих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %. *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Сырье, изменившее окраску (потемневшее, почерневшее). *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок:* суммы алкалоидов в пересчете на хелидонин – не менее 0,6 %.

Приготовление растворов.

Хромотроповой кислоты натриевой соли раствор 1 % в серной кислоте концентрированной. 1,0 г хромотроповой кислоты динатриевой соли растворяют в 100 мл серной кислоты концентрированной в ультразвуковой бане. Срок годности раствора не более 1 мес при хранении в сосудах из темного стекла в прохладном, защищенном от света месте.

Около 0,75 г (точная навеска) сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 500 мл, прибавляют 200 мл уксусной кислоты разведенной 12 % и нагревают на кипящей водяной бане 30 мин при периодическом перемешивании. После охлаждения содержимое колбы с помощью уксусной кислоты разведенной 12 % количественно переносят в мерную колбу вместимостью 250 мл, доводят объем раствора тем же растворителем до метки, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр, отбрасывая первые 20 мл фильтрата.

25,0 мл фильтрата переносят в делительную воронку вместимостью 250 мл, в которую затем последовательно добавляют 6 мл аммиака раствора концентрированного 25 % и 100 мл метиленхлорида и встряхивают в течение 30 мин. После расслоения нижний (органический) слой отделяют. 50 мл органического слоя помещают в круглодонную колбу вместимостью 100 мл и выпаривают при температуре 40 °С на роторном испарителе в вакууме досуха. Сухой остаток растворяют в 2 – 3 мл спирта 96 %, слегка нагревая колбу в горячей воде и переносят раствор в мерную колбу вместимостью 25 мл. Ополаскивают круглодонную колбу 2 раза по 10 мл серной кислоты разведенной 9,8 % и переносят в ту же мерную колбу, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (испытуемый раствор А).

5,0 мл испытуемого раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл хромотроповой кислоты натриевой соли раствора 1 % в серной кислоте концентрированной, закрывают пробкой и тщательно перемешивают. Доводят объем раствора серной кислотой концентрированной до метки и перемешивают (испытуемый раствор Б).

Аналогичным образом готовят раствор сравнения в мерной колбе вместимостью 25 мл, который состоит из 5 мл серной кислоты разведенной 9,8 % и 5 мл хромотроповой кислоты натриевой соли раствора 1 % в серной кислоте концентрированной. Колбу закрывают пробкой и тщательно перемешивают, доводят объем раствора серной кислотой концентрированной до

метки и снова перемешивают.

Оба раствора помещают на кипящую водяную баню на 20 мин. Затем охлаждают до комнатной температуры и, при необходимости, доводят объем раствора серной кислотой концентрированной до метки, перемешивают.

Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора Б на спектрофотометре при длине волны 570 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения.

Содержание суммы алкалоидов в пересчете на хелидонин в абсолютно сухом сырье в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 250 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 25 \cdot 100}{A_{\text{см}}^{1\%} \cdot \text{а} \cdot 25 \cdot 50 \cdot 5 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 250000}{A_{\text{см}}^{1\%} \cdot \text{а} \cdot (100 - W)},$$

где: A – оптическая плотность испытуемого раствора Б;

$A_{\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения продуктов реакции хелидонина с хромотроповой кислотой при длине волны 570 нм, равный 933;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Примечание. В случае завышенного содержание суммы алкалоидов (в пересчете на хелидонина в %) расчет количества лекарственного растительного сырья, необходимого для производства лекарственного препарата следует проводить по формуле, приведенной в ОФС «Лекарственное растительное сырье. Фармацевтические субстанции растительного происхождения».

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Шалфея лекарственного листья **ФС.2.5.0051.15**

Salviae officinalis folia

Собранные в течение лета, высушенные и обмолоченные листья культивируемого полукустарника шалфея лекарственного – *Salvia officinalis* L., сем. яснотковых – *Lamiaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Цельные или частично измельченные листья размером от 1 до 35 мм с черешком или без черешка с небольшим количеством других частей растения (кусочки стеблей, цветков с цветоножками и без них). Поверхность листьев равномерно-морщинистая или мелкоячеистая с густой сетью жилок, сильно вдавленных сверху и выступающих снизу; покрыта длинными волосками, особенно с нижней стороны. Край листа мелкогородчатый. Черешок цилиндрической формы, опушенный, серовато-зеленый или серебристо-белый. Кусочки стеблей четырехгранные, опушенные; цветки с двугубой опушенной чашечкой и двугубым сине-фиолетовым венчиком. Редко встречаются округлые гладкие черные или черно-коричневые семена.

Цвет листьев – зеленый, серовато-зеленый, зеленовато-серый или серебристо-белый; чашечки – светло-коричневый, зеленовато-коричневый, часто с красновато-фиолетовым оттенком; венчика – сине-фиолетовый или фиолетово-коричневый. Запах характерный. Вкус водного извлечения горьковато-пряный, слегка вяжущий.

Измельченное сырье. Кусочки листьев с кусочками листовых черешков,

с небольшим количеством кусочков стеблей, реже цветков с цветоножками и без них, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.

При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки листьев с многочисленными волосками, особенно с нижней стороны; кусочки стеблей, более или менее опушенные, зеленовато-серые, зеленовато-коричневые, светло-коричневые, часто желтовато-белые (эпидермис отделен при измельчении), нередко продольно-расщепленные с белой губчатой сердцевиной; цельные светло-коричневые, зеленовато-коричневые, часто с красновато-фиолетовым оттенком чашечки или их кусочки с многочисленными железками на поверхности; кусочки сине-фиолетового или фиолетово-коричневого венчика; округлые гладкие черные или черно-коричневые семена.

Цвет измельченного сырья серовато-зеленый, зеленовато-серый или серебристо-белый с зеленовато-коричневыми, светло-коричневыми, желтовато-белыми, белыми, красновато-фиолетовыми и редкими коричневыми вкраплениями. Запах характерный. Вкус водного извлечения горьковато-пряный, слегка вяжущий.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении листа с поверхности видны клетки верхнего эпидермиса, которые имеют многоугольную форму со слабоизвилистыми стенками, клетки нижнего эпидермиса также многоугольной формы, более извилистостенные. Устьица расположены, главным образом, на нижней стороне листа, окружены 2 околоустьичными клетками, расположенными перпендикулярно устьичной щели (диацитный тип). Над жилкой клетки эпидермиса вытянутые, их стенки почти прямые. Эфирномасличные железки располагаются с обеих сторон листовой пластинки, округлой формы, с просвечивающейся ножкой и трудно различимыми, радиально расходящимися 6 – 8 выделительными клетками, заполненными бесцветным или желтоватым эфирным маслом. Волоски простые и головчатые. Простые волоски многочисленные. Головчатые волоски мелкие, состоят из короткой 1-, 3-клеточной ножки и шаровидной 1-,

2-клеточной головки, лучше заметны по краю и по жилке листа.

Клетки эпидермиса черешка прозенхимной формы. Эпидермис опушен многочисленными простыми и головчатыми волосками. Простые волоски многоклеточные. Головчатые волоски состоят из короткой 1-, 3-клеточной ножки и шаровидной одноклеточной головки. По эпидермису черешка встречаются эфирномасличные железки округлой формы, с просвечивающейся ножкой и трудно различимыми, радиально расходящимися 6 – 8 выделительными клетками и бесцветными или желтоватыми каплями эфирного масла. Механическая ткань на поперечном срезе представлена уголковой колленхимой, расположенной в 1 – 3 слоя под эпидермисом, в ушках – в 3 – 5 слоев. Проводящая система представлена 3 закрытыми коллатеральными пучками, наиболее крупный из них располагается в центре черешка и 2 более мелких – в боковых выростах. Центральный пучок окружает нечетко выраженный слой эндодермы.

Измельченное сырье. При рассмотрении микропрепаратов видны фрагменты листовой пластинки с многоугольными слабоизвилистыми эпидермальными клетками (верхний эпидермис) и многоугольными извилистостенными эпидермальными клетками (нижний эпидермис); с устьицами диацитного типа, расположенными чаще на нижней стороне листовой пластинки. Встречаются фрагменты листа и черешка с простыми и головчатыми волосками, с эфирномасличными железками.

Многочисленные волоски 2 типов: простые многоклеточные, нижние клетки их (чаще 2 – 4) короткие, со значительно утолщенными стенками, верхняя клетка длинная, изогнутая, с тонкими стенками, и головчатые – мелкие, с короткой 1-, 3-клеточной ножкой и шаровидной 1-, 2-клеточной головкой. Эфирномасличные железки округлой формы с просвечивающейся ножкой и трудно различимыми, радиально расходящимися 6 – 8 выделительными клетками, заполненными бесцветным или желтоватым эфирным маслом.

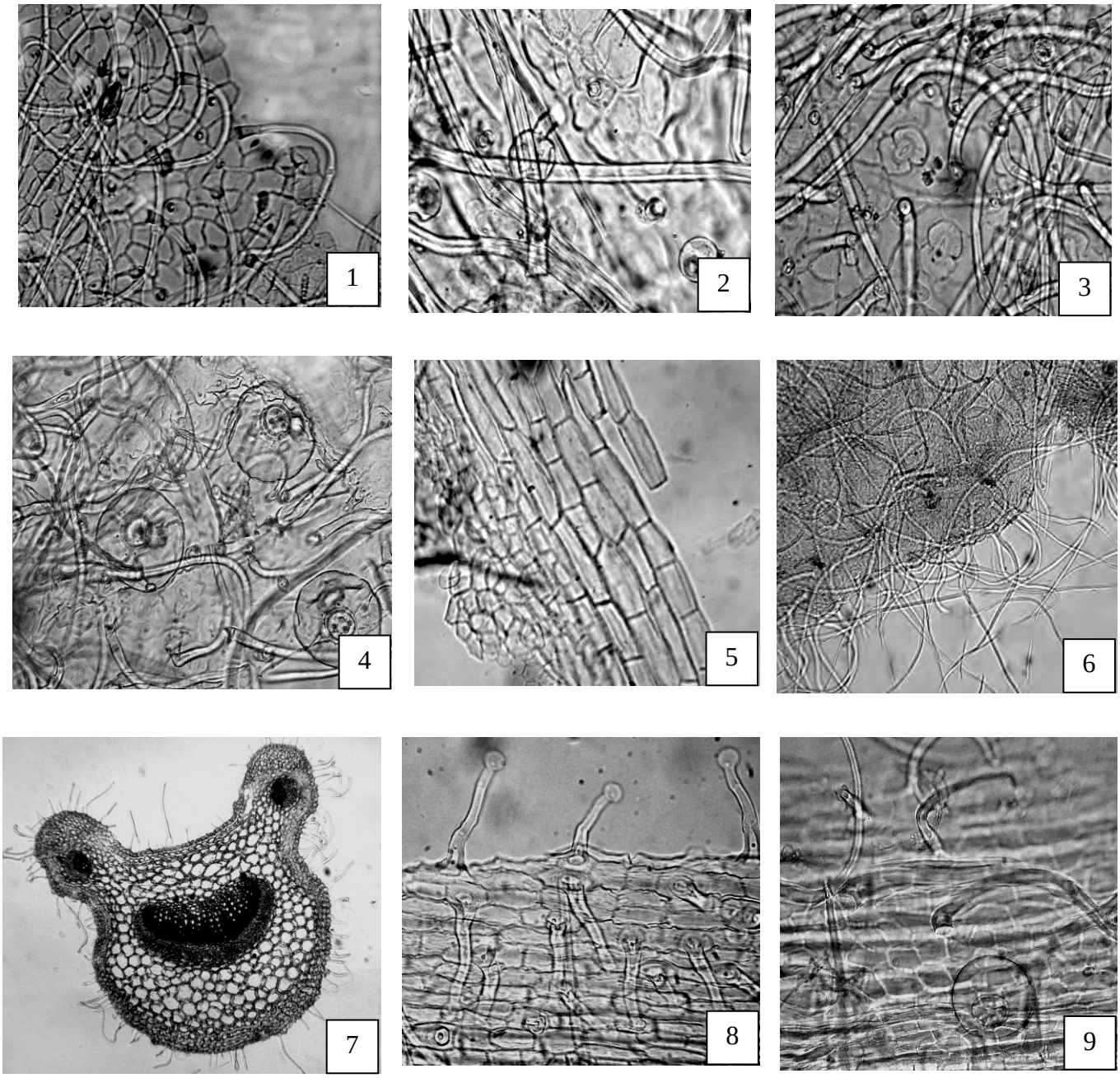


Рисунок – Шалфея листья.
1 – фрагмент верхнего эпидермиса листа с простыми волосками (300×), 2 – фрагмент верхнего эпидермиса листа с простыми и головчатыми волосками (600×), 3 – фрагмент нижнего эпидермиса листа с простыми волосками, устьицами диацитного типа (300×), 4 – фрагмент нижнего эпидермиса листа с эфирномасличными железками (вид сверху) (300×), 5 – фрагмент эпидермиса вдоль жилки листа (300×), 6 – фрагмент края листа с простыми волосками (120×), 7 – поперечный срез черешка листа (80×), 8 – фрагмент эпидермиса черешка листа с головчатыми волосками (200×), 9 – фрагмент эпидермиса черешка листа с простыми волосками и эфирномасличной железкой (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

1. ***Тонкослойная хроматография***

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) лютеолин-7-глюкозида. Около 0,01 г СО лютеолин-7-глюкозида растворяют в 10 мл спирта 70 % при нагревании и перемешивают. Срок годности раствора 3 мес.

Раствор СО цинеола. Около 0,01 г СО цинеола растворяют в 10 мл спирта 70 % и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор для детектирования. Состоит из двух растворов: ванилина раствора 1 % в спирте 96 % и серной кислоты раствора спиртового 10 %, которые смешивают в равных частях. Раствор используют свежеприготовленным.

а) Около 0,5 г препарата помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 25 мл спирта 70 %, колбу присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на водяной бане в течение 45 минут, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок колбы. Колбу с содержимым искусственно охлаждают до комнатной температуры. Полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 10 мкл испытуемого раствора, рядом наносят 5 мкл раствора СО лютеолин-7-гликозида. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе в течение 5 мин, помещают в камеру (без предварительного насыщения) с системой растворителей этилацетат – муравьиная кислота безводная – вода (14:3:3) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителя пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, затем обрабатывают алюминия хлорида раствором 5 % в спирте 70 %, после чего просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО лютеолин-7-глюкозида должна обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией желтого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться зона

адсорбции с флуоресценцией желтого цвета на уровне зоны адсорбции СО лютеолин-7-глюкозида; допускается обнаружение дополнительных зон адсорбции (флавоноиды).

б) На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 5 мкл раствора эфирного масла листьев шалфея (см. раздел «Количественное определение. Эфирное масло») в спирте 96 % (1:10) и 10 мкл раствора СО цинеола. Пластинку с нанесенными пробами сушат, помещают в камеру с системой растворителей толуол – этилацетат (93:7) (без предварительного насыщения) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, обрабатывают раствором для детектирования. Пластинку выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100 °С в течение 5 мин, после чего просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО цинеола должна обнаруживаться зона адсорбции синего цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться: зона адсорбции синего цвета на уровне зоны адсорбции СО цинеола, зона адсорбции сине-фиолетового цвета ниже уровня зоны адсорбции СО цинеола, зона адсорбции синего цвета ниже уровня зоны адсорбции СО цинеола, зона адсорбции красно-фиолетового цвета выше уровня зоны адсорбции СО цинеола, зона адсорбции красно-коричневого или красно-фиолетового цвета выше уровня зоны адсорбции СО цинеола; допускается обнаружение дополнительных зон адсорбции (терпеноиды).

2. ***Качественные реакции***

К 2 – 3 мл испытуемого раствора А (см. раздел «Количественное определение дубильных веществ») прибавляют 2 капли железа(III) аммония сульфата раствора 10 % (железоаммониевых квасцов**)**, раствор окрашивается в черно-зеленый цвет (дубильные вещества).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 14 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 12 %.

Зола, не растворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Изменившие окраску (потемневшие и почерневшие) кусочки листьев. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 5 %.

Другие части растения (цветки и кусочки стеблей). *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 13 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье:*

эфирного масла – не менее 0,8 %, дубильных веществ в пересчете на танин – не менее 4,5 %, экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 50 %, – не менее 30 %.

Определение эфирного масла проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1 или 2, навеска сырья – 30,0 г, сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, время перегонки – 2 ч.)

Определение дубильных веществ в пересчете на танин проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Определение экстрактивных веществ проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (экстрагент – спирт 50 %).

Примечание. Определение эфирного масла и дубильных веществ проводят для сырья, предназначенного для производства лекарственных растительных препаратов (пачки); определение эфирного масла проводят в сырье, предназначенном для получения эфирного масла; определение экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 50 %, проводят для сырья, предназначенного для производства экстрактов.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Шиповника плоды	**ФС.2.5.0106.18**
Rosae fructus	**Взамен ГФ XI, вып. 2, ст. 38**
	(изм. № 4 от 19.08.1998)

Собранные в период полного созревания и высушенные плоды дикорастущих и культивируемых кустарников различных видов шиповника (розы) – *Rosa*: шиповника майского – *R. majalis Herrm*. (*R. cinnamomea* L.); шиповника иглистого – *R. acicularis Lindl*.; шиповника даурского – *R. davuricaPall.*; шиповника Беггера – *R. beggeriana Schrenk*.; шиповника Федченко – *R. fedtschenkoana Regel*.; шиповника морщинистого – *R. Rugosa Thunb*. и других видов шиповника, сем. розоцветных – *Rosaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Цельные, очищенные от чашелистиков и плодоножек ложные плоды разнообразной формы: от шаровидной, яйцевидной или овальной до сильно вытянутой веретеновидной; длина плодов – 0,7 - 3 см, диаметр 0,6 - 1,7 см. На верхушке плода имеется небольшое круглое отверстие или пятиугольная площадка. Плоды состоят из разросшегося мясистого, при созревании сочного цветоложа (гипантия) и заключенных в его полости многочисленных плодиков – орешков. Стенки высушенных плодов твердые, хрупкие, наружная поверхность блестящая, реже матовая, более или менее морщинистая. Внутри плоды обильно выстланы длинными, очень жесткими щетинистыми волосками. Орешки мелкие, продолговатые, со слабо выраженными гранями.

Цвет плодов от оранжево-красного до коричневато-красного, орешков – светло-желтый, иногда коричневатый. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения кисловато-сладкий, слегка вяжущий.

Измельченное сырье. Кусочки гипантия различной формы, с одной стороны морщинистые, с другой – покрытые жесткими щетинистыми волосками. Цвет от оранжево-красного до коричневато-красного, красно-коричневого и красно-черного. Мелкие, твердые, продолговатые орешки, слегка сдавленные с боков со слабо выраженными гранями, или их кусочки.

Цвет светло-желтый или коричневато-желтый. Изредка встречаются части чашелистиков и плодоножек. Цвет от серо-зеленого до коричневато-зеленого и темно-коричневого. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения кисловато-сладкий, слегка вяжущий.

Порошок. Смесь частиц гипантия, орешков и изредка частей чашелистиков и плодоножек, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

Цвет гипантия от оранжево-красного до коричневого; орешков – от светло-желтого до оранжево-желтого, иногда коричневатого; чашелистиков и плодоножек – от серо-зеленого до коричневато-зеленого и коричневого. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения кисловато-сладкий, слегка вяжущий.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении микропрепарата плодов должны быть видны: наружный слой эпидермиса гипантия (плода) в виде светло-желтых пластов, состоящих из многоугольных клеток с прямыми неодинаково утолщенными (так называемого окончатого типа), местами четковидно-утолщенными стенками, редкими устьицами; мякоть плода, состоящая из тонкостенных паренхимных клеток, содержащих оранжево-красные хромопласты с каротиноидами и многочисленными друзами оксалата кальция; околоплодник орешка, состоящий из групп или пластов, реже одиночных каменистых клеток с сильно утолщенными пористыми волосками; многочисленные крупные одноклеточные волоски (или их фрагменты) двух типов – очень крупные прямые с толстыми стенками и узкой

полостью и более мелкие, слегка извилистые с широкой полостью; проводящие пучки со спиральными сосудами.

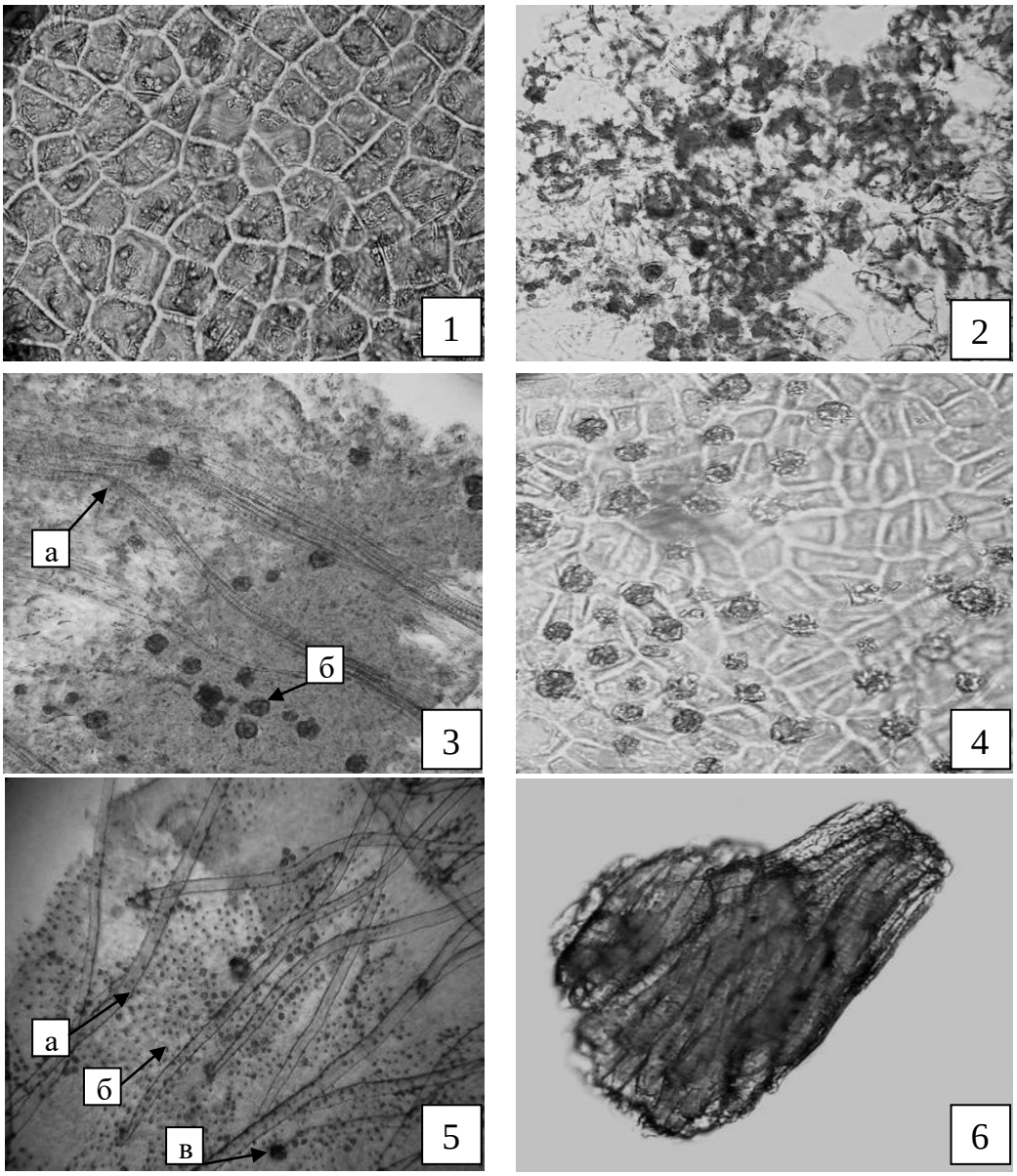


Рисунок 1 – Шиповника плоды
1 – клетки наружного эпидермиса (200×); 2 – паренхима гипантия («давленый» микропрепарат). Клетки паренхимы с глыбками каротиноидов (200×); 3 – паренхима гипантия («давленый» микропрепарат): а –проводящие пучки; б– друзы оксалата кальция (200×); 4 – Внутренний эпидермис гипантия с поверхности. Клетки мезофилла с друзами (100×); 5 – Внутренний эпидермис гипантия с поверхности: а – простые волоски, б – места прикрепления простых волосков, в – просвечивающиеся друзы оксалата кальция (100×); 6 – Фрагмент околоплодника орешка. Каменистые клетки. (200×).

Измельченное сырье. При рассмотрении микропрепарата измельченных плодов должны быть видны фрагменты наружного эпидермиса гипантия в виде светло-желтых пластов, состоящие из многоугольных клеток с прямыми, неодинаково утолщенными стенками (окончатый тип) и редкими устьицами; обрывки мякоти гипантия из тонкостенных паренхимных клеток, содержащие оранжево-красные хромопласты и многочисленные друзы оксалата кальция, многочисленные крупные одноклеточные волоски (или их обломки) двух типов: очень крупные прямые с толстыми стенками и узкой полостью и мелкие извилистые с широкой полостью; обрывки проводящих пучков со спиральными сосудами. Кроме того, видны фрагменты околоплодника орешка, состоящие из групп или пластов, реже одиночных каменистых клеток с сильно утолщенными пористыми оболочками.

Порошок. При рассмотрении микропрепарата порошка плодов должны быть видны фрагменты наружного эпидермиса гипантия в виде светло-желтых пластов, состоящие из многоугольных клеток (окончатый тип) с прямыми, неодинаково утолщенными стенками. Также встречаются фрагменты мякоти гипантия, состоящие из тонкостенных паренхимных клеток, содержащих оранжево-красные хромопласты и многочисленные друзы оксалата кальция. Обнаруживаются многочисленные крупные одноклеточные волоски, обрывки проводящих пучков со спиральными сосудами. Кроме того, в препаратах порошка видны фрагменты околоплодника орешка с каменистыми клетками.

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) аскорбиновой кислоты. Около 0,0012 г СО аскорбиновой кислоты растворяют в 5 мл натрия метабисульфита раствора 0,1 % и перемешивают. Срок годности раствора 3-5 ч.

Раствор натрия метабисульфита 0,1 %. 0,01 г натрия метабисульфита помещают в коническую колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 10 мл воды,

перемешивают до полного растворения. Раствор используют свежеприготовленным.

Около 1,0 г сырья измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито отверстиями размером 3 мм, помещают в колбу вместимостью 50 мл, приливают 10 мл воды, настаивают в течение 1 - 2 ч при комнатной температуре и фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки наносят 2 мкл (0,002 мл) испытуемого раствора и 3 мкл (0,003 мл) раствора СО аскорбиновой кислоты. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную смесью растворителей этилацетат : уксусная кислота ледяная (80:20), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей в течение 5 мин, обрабатывают 2,6-дихлорфенолиндофенолятом натрия раствором 0,044 % (приготовление: раздел «Количественное определение») и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО аскорбиновой кислоты должна обнаруживаться зона адсорбции белого цвета на розовом фоне.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции белого цвета на розовом фоне на уровне зоны адсорбции СО аскорбиновой кислоты; допускается обнаружение дополнительных зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* - не более 15 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* - не более 7 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* - не более 3 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье* - измельченных частиц плодов, в том числе орешков, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, не более 3 %. *Измельченное сырье*: частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм, - не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,2 мм, - не более 5 %. *Порошок* - частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, - не более 8 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм - не более 5 %.

Посторонние примеси

Другие части шиповника (кусочки веточек, чашелистиков и плодоножек). *Цельное сырье* - не более 2 %.

Части гипантия. *Цельное сырье* - не более 20 %.

Плоды почерневшие, пригоревшие, поврежденные вредителями и болезнями. *Цельное сырье* - не более 1 %.

Органическая примесь (посторонних плодов и веточек). *Цельное сырье, измельченное сырье* - не более 0,5 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* - не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок*: аскорбиновой кислоты - не менее 0,2 %; суммы каротиноидов в пе-

ресчете на β-каротин – не менее 300 мг%; суммы флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 0,4 %.

Аскорбиновая кислота.

Приготовление растворов.

Раствор 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия 0,044 %. 0,22 г 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия растворяют в 500 мл свежепрокипяченной и охлажденной воды при энергичном взбалтывании (для растворения навески раствор оставляют на ночь). Раствор фильтруют в мерную колбу вместимостью 1 л, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Срок годности раствора 7 суток при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Установка титра. Несколько кристаллов (3-5) аскорбиновой кислоты растворяют в 50 мл серной кислоты раствора 2 %; 5 мл полученного раствора титруют из микробюретки раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия до появления розового окрашивания, не исчезающего в течение 1-2 мин. Другие 5 мл этого же аскорбиновой кислоты раствора титруют калия йодата раствором 0,001 М в присутствии нескольких кристаллов (около 2 мг) калия йодида и 2-3 капель крахмала раствора до появления голубого окрашивания. Поправочный коэффициент вычисляют по формуле:

$$К = \frac{V}{V_1}$$

где: V - объем 0,001 М раствора калия йодата, пошедшего на титрование, в мл;

V_1 - объем раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, пошедшего на титрование, в мл.

Аналитическую пробу сырья грубо измельчают и около 20,0 (точная навеска) измельченного сырья помещают в фарфоровую ступку, тщательно растирают со стеклянным порошком (около 5,0 г), постепенно добавляя 300 мл воды, и настаивают в течение 10 мин. Затем смесь размешивают и извлечение фильтруют.

1,0 мл полученного фильтрата помещают в колбу для титрования вместимостью 100 мл, добавляют 1 мл хлористоводородной кислоты раствора 2 %, 13 мл воды, перемешивают и титруют из микробюретки 0,001 М раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия до появления розовой окраски, не исчезающей в течение 30-60 с. Титрование продолжают не более 2 мин. В случае интенсивного окрашивания фильтрата или высокого содержания в нем аскорбиновой кислоты (расход 0,001 М раствора 2,6-дихлорфенол-

индофенолята натрия более 2 мл, обнаруженного пробным титрованием), исходное извлечение разбавляют водой в 2 раза или более.

Содержание аскорбиновой кислоты в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{V \cdot 0{,}000088 \cdot K \cdot 300 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot 1 \cdot (100 - W)} = \frac{V \cdot 264 \cdot K}{a \cdot (100 - W)},$$

где: 0,000088 - количество аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл 0,001 М раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, г;

V - объем 0,001 М раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, пошедшего на титрование, мл;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %;

K – поправочный коэффициент к титру.

Допускается содержание аскорбиновой кислоты определять по следующей методике.

Аналитическую пробу сырья грубо измельчают и около 20,0 (точная навеска) измельченного сырья помещают в фарфоровую ступку, тщательно растирают со стеклянным порошком (около 5,0 г), постепенно добавляя 50 мл воды. Полученную смесь количественно переносят в мерную колбу вместимостью 250 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Около 50 мл извлечения фильтруют, отбрасывая первые 10 мл фильтрата.

5,0 мл полученного фильтрата и переносят в колбу для титрования вместимостью 250 мл, прибавляют 1 мл хлористоводородной кислоты раствора 2 %, 10 мл воды, 0,5 мл калия йодида раствора 1 %, 2 - 3 капли раствора крахмала и титруют 0,001 М раствором калия йодата до появления голубого окрашивания, не исчезающего в течение 30 сек. Параллельно проводят контрольный опыт.

Содержание аскорбиновой кислоты в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(V - V_0) \cdot 0{,}000528 \cdot К \cdot 250 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot 5 \cdot (100 - W)} = \frac{(V - V_0) \cdot 264 \cdot К}{a \cdot (100 - W)},$$

где: 0,000528 – количество аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл 0,001 М раствора калия йодата, г;

V – объем 0,001 М раствора калия йодата, пошедшего на титрование, мл;

V_o - объем 0,001 М раствора калия йодата, пошедшего на титрование контрольного опыта, мл;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %;

К - поправочный коэффициент к титру.

Сумма каротиноидов в пересчете на β-каротин.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм.

Около 2,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 20 мл гексана и перемешивают в течение 20 мин с помощью механического шейкера. Полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр, смоченный гексаном, в коническую колбу вместимостью 250 мл. Извлечение повторяют еще дважды с 20 мл гексана, фильтруя через тот же фильтр в ту же колбу.

5,0 мл объединенного фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (испытуемый раствор).

В случае получения интенсивно окрашенного извлечения перед измерением оптической плотности его дополнительно разводят, используя гексан.

Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 450 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения. В качестве раствора сравнения используют гексан.

Содержание суммы каротиноидов в пересчете на β-каротин и абсолютно сухое сырье в мг % (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 10 \cdot 100 \cdot 100}{A_{1см}^{1\%} \cdot a \cdot 5 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 50000000}{A_{1см}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)}$$

где:

А - оптическая плотность испытуемого раствора;

$A_{1см}^{1\%}$ - удельный показатель поглощения β-каротина в гексане при длине волны 450 нм, равный 2592;

а - навеска сырья, г;

10 - содержание β-каротина в 1 мл 1 % раствора в гексане, мг;

5, 25 - разведение, мл.

Сумма флавоноидов в пересчете на рутин.

Приготовление растворов.

Раствор СО рутина. Около 0,05 г (точная навеска) СО рутина, предварительно высушенного при температуре 130 – 135 °С в течение 3 ч, растворяют в 85 мл спирта 96 % в мерной колбе вместимостью 100 мл при нагревании на водяной бане, охлаждают, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор А СО рутина). Срок годности не более 1 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

2,0 мл раствора А СО рутина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 %, 0,1 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, доводят объем раствор спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б СО рутина).

Около 3,0 г (точная навеска) сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 80 мл спирта 70 %, присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на кипящей водяной бане в течение 45 мин, после охлаждения до комнатной температуры содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл, объем раствора в колбе доводят спиртом 70 % до метки (раствор А испытуемого раствора) и перемешивают.

2,0 мл раствора А испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 %, 0,1 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора).

Оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора измеряют на спектрофотометре при длине волны 415 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм

относительно раствора сравнения. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2,0 мл раствора А испытуемого раствора, 0,1 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, помещенный в мерную колбу вместимостью 25 мл и доведенный спиртом 96 % до метки.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО рутина в аналогичных условиях. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2 мл раствора А СО рутина, 0,1 мл уксусной кислоты разведенной 30 % и доведенный спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в абсолютно сухом сырье в процентах (Х) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 100 \cdot 2 \cdot 25 \cdot \text{P} \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 100 \cdot 25 \cdot 2 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot a_0 \cdot 10000 \cdot \text{P}}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
A_o – оптическая плотность раствора Б СО рутина;
a – навеска сырья, г;
a_o – навеска СО рутина, г;
P – содержание основного вещества в СО рутина, %;
W – влажность сырья, %.

Допускается содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин вычислять с использованием удельного показателя поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1см}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 250000}{A_{1см}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлорида при длине волны 415 нм, равный 248;
a – навеска сырья, г;
W – влажность сырья, %.

Примечание. Содержание аскорбиновой кислоты определяют в сырье, предназначенном для производства лекарственных растительных препаратов

в форме выпуска: пачки, фильтр-пакеты; содержание суммы каротиноидов в пересчете на β-каротин определяют в сырье, предназначенном для производства масла; содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин определяют в сырье, предназначенном для производства препарата «Холосас».

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Щавеля конского корни **ФС.2.5.0052.15**

Rúmicis conférti radices

Собранные осенью или весной, тщательно отмытые и высушенные корни дикорастущего многолетнего травянистого растения щавеля конского – *Rúmex conférтus* Willd., сем.гречишных –*Polygonaceae.*

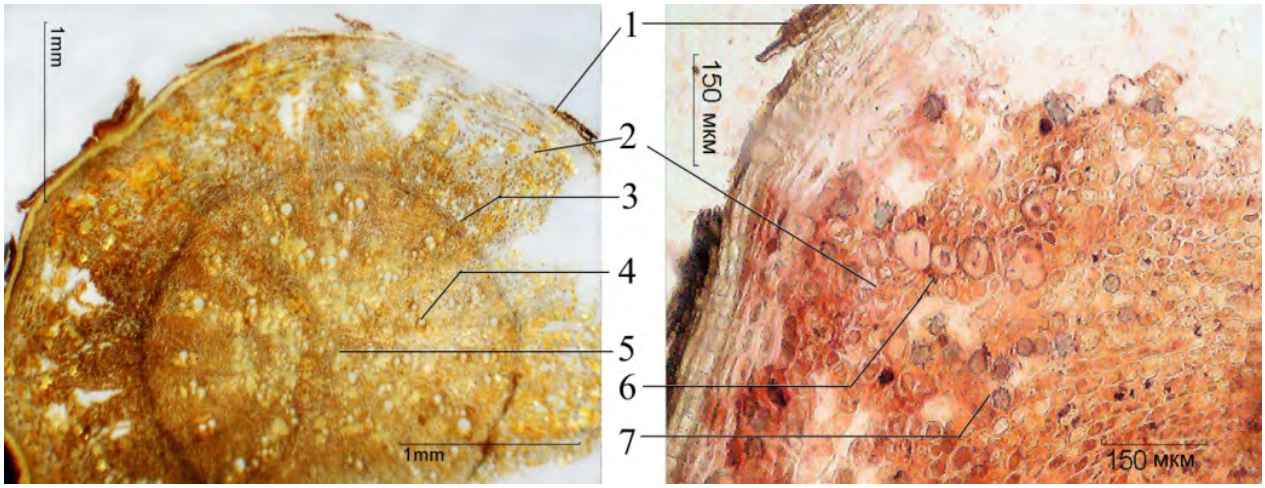
ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки.*Цельное сырье.*Цельные или продольно разрезанные корни, твердые, продольно-морщинистые, прямые или слегка изогнутые, длиной 3–10 см, толщиной 2–10 см. Излом неровный. Цвет снаружи –темно-коричневый, на изломе –желтовато-коричневый или серовато-коричневый, внутри –желто-оранжевый. Запах слабый, характерный. Вкус водного извлечения горьковатый, вяжущий.

Микроскопические признаки.*Цельное сырье.* При рассмотрении на поперечном срезе должно быть видно вторичное строение корня: пробковый слой состоит из старых слущивающихся слоев и новых слоев, состоящих из ровных 3–5 рядов клеток правильной прямоугольной формы. К центру от пробки находится основная паренхима коровой части корня, прямоугольные клетки которой имеют более или менее утолщенные клеточные стенки, неправильное очертание полостей и располагаются рядами –от 8 до 10. К центру от камбия расположены элементы вторичной ксилемы, а к периферии – вторичная флоэма. Во вторичной ксилеме хорошо заметны 3 – 4 широких первичных радиальных луча паренхимы, достигающих центра корня, первичной ксилемы.

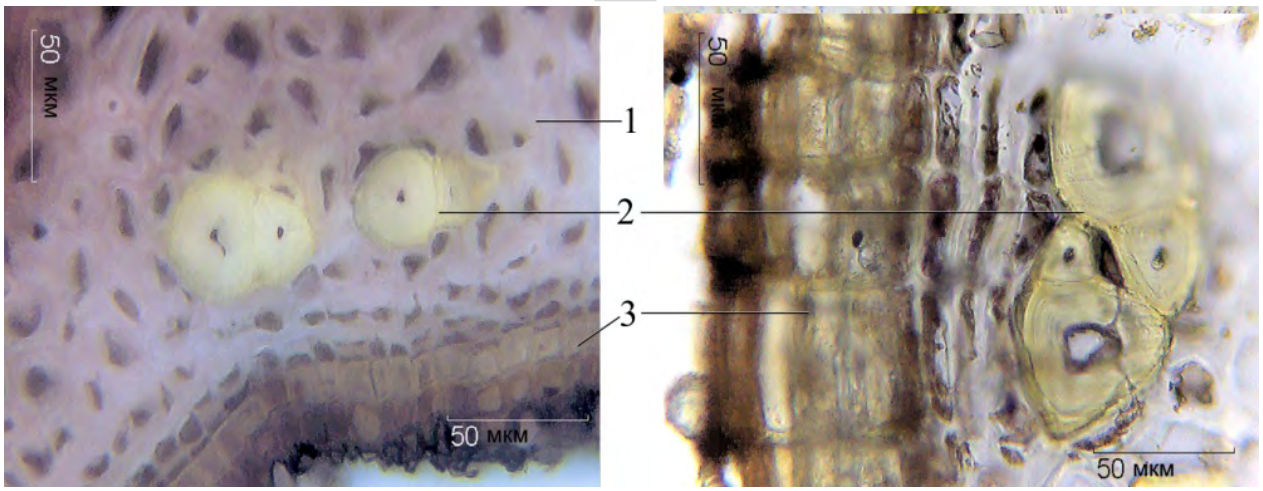
На продольном срезе коровой части хорошо заметны элементы механической ткани – склереиды. Они представлены клетками округлой формы, желтого цвета с серединным щелевидным просветом, в которых отсутствуют или изредка присутствуют поровые каналы.

Лубяные волокна локализуются во флоэме корня и в поперечном сечении имеют продолговатую, прозенхимную форму.



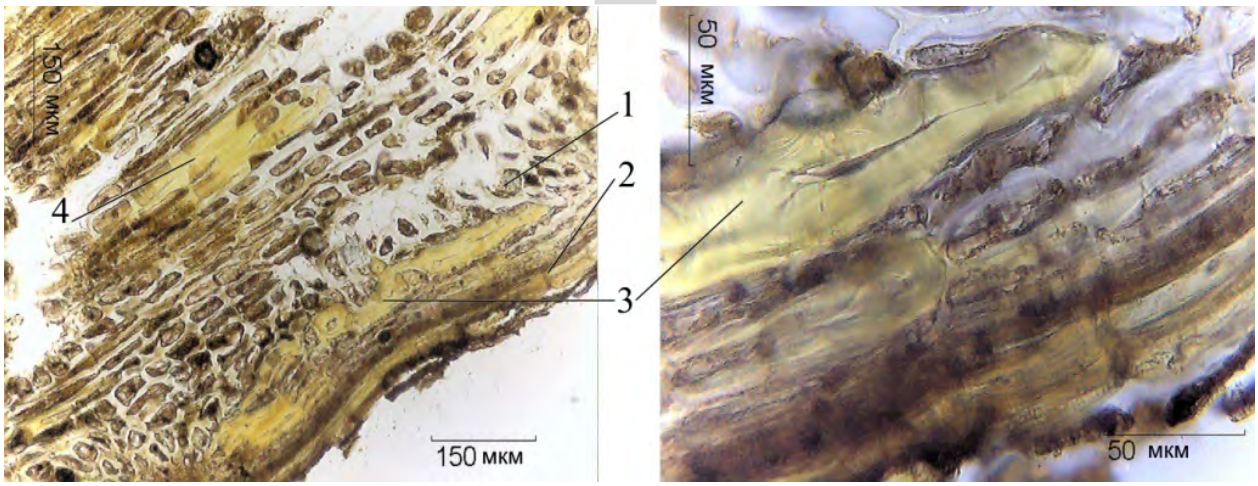
а б

1



аб

2



3

Рисунок–Щавеля конскогокорни.

1– поперечный срез: а – общий вид (20×), б –фрагмент коры (100×) (1 – пробка; 2 – паренхима коры; 3 – камбий; 4 –сосуды ксилемы; 5 – первичная ксилема; 6 – каменистые клетки; 7 – друзы),
2– продольный срез: 1 – паренхима коровой части; 2 – склереиды; 3 – пробка (400×);
3– продольный срез. Коровая часть: а – общий вид (100×), б – паренхима коровой части (400×) (1 – паренхима коровой части; 2 – пробка; 3 – склереиды; 4 – лубяные волокна).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 10 мкл испытуемого раствора (см. раздел «Количественное определение» приготовление раствораБ испытуемого раствора) и 20 мкл раствора стандартного образца (СО) 8-О-β-D-глюкозида эмодина (см. раздел «Количественное определение» приготовление раствора А СО 8-О-β-D-глюкозида эмодина). Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 1 ч смесью растворителей бутанол–уксусная кислота ледяная–вода (4:1:5),и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 –90 %длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей. Пластинку обрабатывают диазореактивом, нагревают при 100–105 °С в течение 5 мин и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО 8-О-β-D-глюкозида эмодинадолжна обнаруживаться зона адсорбции розового цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции розового цвета на уровне зоны адсорбции СО 8-О-β-D-глюкозида эмодина; допускается обнаружение других зон адсорбции (антраценпроизводные).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье* – не более 13 %.

Зола общая. *Цельное сырье***–**не более 10 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье*–не более 5 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Корневища с остатками неотделенных стеблей.*Цельное сырье* – не более 5 %.

Кусочки корней короче 2 см.*Цельное сырье* – не более 3 %.

Органическая примесь.*Цельное сырье* – не более 1 %.

Минеральная примесь.*Цельное сырье* – не более 0,5%.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырьеи лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье:* сумма антраценпроизводных в пересчете на 8-О-β-D-глюкозидэмодина–не менее 3 %.

Приготовление растворов.

Раствор СО 8-О-β-D-глюкозида эмодина. Около 0,02 г (точная навеска) СО 8-О-β-D-глюкозида эмодина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 30 мл спирта 96 % при нагревании. Затем содержимое колбы охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор АСО 8-О-β-D-глюкозида эмодина).Срок годности раствора 30 сут.

1,0 мл растворАСО 8-О-β-D-глюкозида эмодина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора щелочно-аммиачным раствором до метки, перемешивают, затем раствор переносят в колбу вместимостью 50 мл и нагревают с обратным холодильником на водяной бане в течение 15 мин и охлаждают (раствор Б СО 8-О-β-D-глюкозида эмодина).

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером1 мм.Около 1,0 г(точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл спирта70%, взвешивают с точностью до± 0,01 г, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане (умеренное кипение) в течение 90 мин. Затем охлаждают в течение 30 мин, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр (раствор А испытуемого раствора)

1,0 мл раствора А испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора щелочно-аммиачным раствором до метки,перемешивают и нагревают в течение 15 мин на водяной бане с обратным холодильником (раствор Б испытуемого раствора). После охлаждения измеряют оптическую плотность раствораБиспытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 520 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют:
1 мл спирта 70 % помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора щелочно-аммиачным раствором до метки, перемешивают и нагревают в течение 15 мин на водяной бане с обратным холодильником.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО 8-О-β-D-глюкозида эмодина.В качестве раствора сравнения используют: 1 мл спирта 96 % помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем щелочно-аммиачным раствором до метки, перемешивают, помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и нагревают в течение 15 мин на водяной бане с обратным холодильником.

Содержание суммы антраценпроизводных в пересчете на 8-О-β-D-глюкозида эмодинв абсолютно сухом сырье в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 50 \cdot a_0 \cdot 1 \cdot P \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 1 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot a_0 \cdot P \cdot 2000}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствораБиспытуемого раствора;
A_o – оптическая плотность раствора Б СО 8-О-β-D-глюкозида эмодина;
a – навеска сырья, г;
a_o – навеска СО 8-О-β-D-глюкозида эмодина, г;
P – содержание основного вещества в СО 8-О-β -D-глюкозида эмодина, %;
W – влажность сырья, %.

Допускается содержание суммы антраценпроизводныхв пересчете на 8-О-β-D-глюкозида эмодин вычислять с использованием удельного показателя поглощения 8-О-β-D-глюкозида эмодина с щелочно-аммиачным раствором по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 50 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 250000}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
$A_{1см}^{1\%}$ –удельный показатель поглощения 8-О-β-D-глюкозида эмодинас щелочно-аммиачным растворомпри длине волны 520 нм, равный 160;
a – навеска сырья, г;
W – влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Эвкалипта прутовидного листья **ФС.2.5.0107.18**

Eucalypti viminalis folia **Взамен ГФ XI, вып. 2, ст. 15**

Собранные поздней осенью, зимой или ранней весной и высушенные листья культивируемого дерева эвкалипта прутовидного - *Eucalyptus viminalis* Labill., семейства миртовых - *Myrtaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Смесь двух типов листьев: листья старых ветвей - черешковые от узколанцентных до серповидно-изогнутых, остроконечные, плотные, длиной 4-27 см, шириной 0,5-5 см; листья молодых ветвей - сидячие с округлым основанием или с короткими черешками (длина черешков от 0,6 до 1,5 см, форма черешка на поперечном сечении овальная с адаксиальной стороны немного сплюснутая), удлиненно-яйцевидной формы, на верхушке заостренные, длиной 3,5-11 см, шириной 0,7-4 см. Встречаются листья, имеющие переходящую форму от удлиненно-яйцевидной до ланцетной. Листья голые с цельным, ровным или волнистым краем с многочисленными точками, просвечивающимися в проходящем ярком свете (вместилища с эфирным маслом).

Цвет листьев от светло-зеленого до серовато-зеленого, иногда с фиолетовым оттенком и слабым сизоватым налетом.

Запах ароматный, усиливающийся при растирании. Вкус водного извлечения пряно-горький.

Измельченное сырье. Смесь кусочков листьев различной формы, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм.

Цвет кусочков листьев от светло-зеленого до серовато-зеленого, иногда с фиолетовым оттенком и слабым сизоватым налетом.

Запах ароматный, усиливающийся при растирании. Вкус водного извлечения пряно-горький.

Микроскопические признаки. *Цельное, измельченное сырье*. При рассмотрении микропрепаратов листа с поверхности должны быть видны фрагменты листа или его эпидермиса, состоящего из многоугольных клеток, покрытых толстым слоем кутикулы, выступающим в виде бугорков; устьица погружены в мезофилл; часто встречаются круглые пробковые пятна коричневого цвета; в мезофилле – округлые или овальные крупные схизогенные эфирномасличные вместилища с 1-2 слоями выделительных клеток; жилки с кристаллоносной обкладкой, состоящей как из призматических кристаллов, так и из друз оксалата кальция, в клетках мезофилла также встречаются друзы оксалата кальция.

При рассмотрении микропрепаратов черешка должны быть видны клетки эпидермиса мелкие, стенки которых сильно утолщены и кутинизированы. В коровой паренхиме по окружности под эпидермой расположены округлые вместилища разного размера с каплями эфирного масла желто-оранжевого цвета. Проводящие элементы, которые собраны в один крупный закрытый коллатеральный пучок, окруженные склеренхимными волокнами. В тканях флоэмы наблюдается значительное количество призматических монокристаллов.

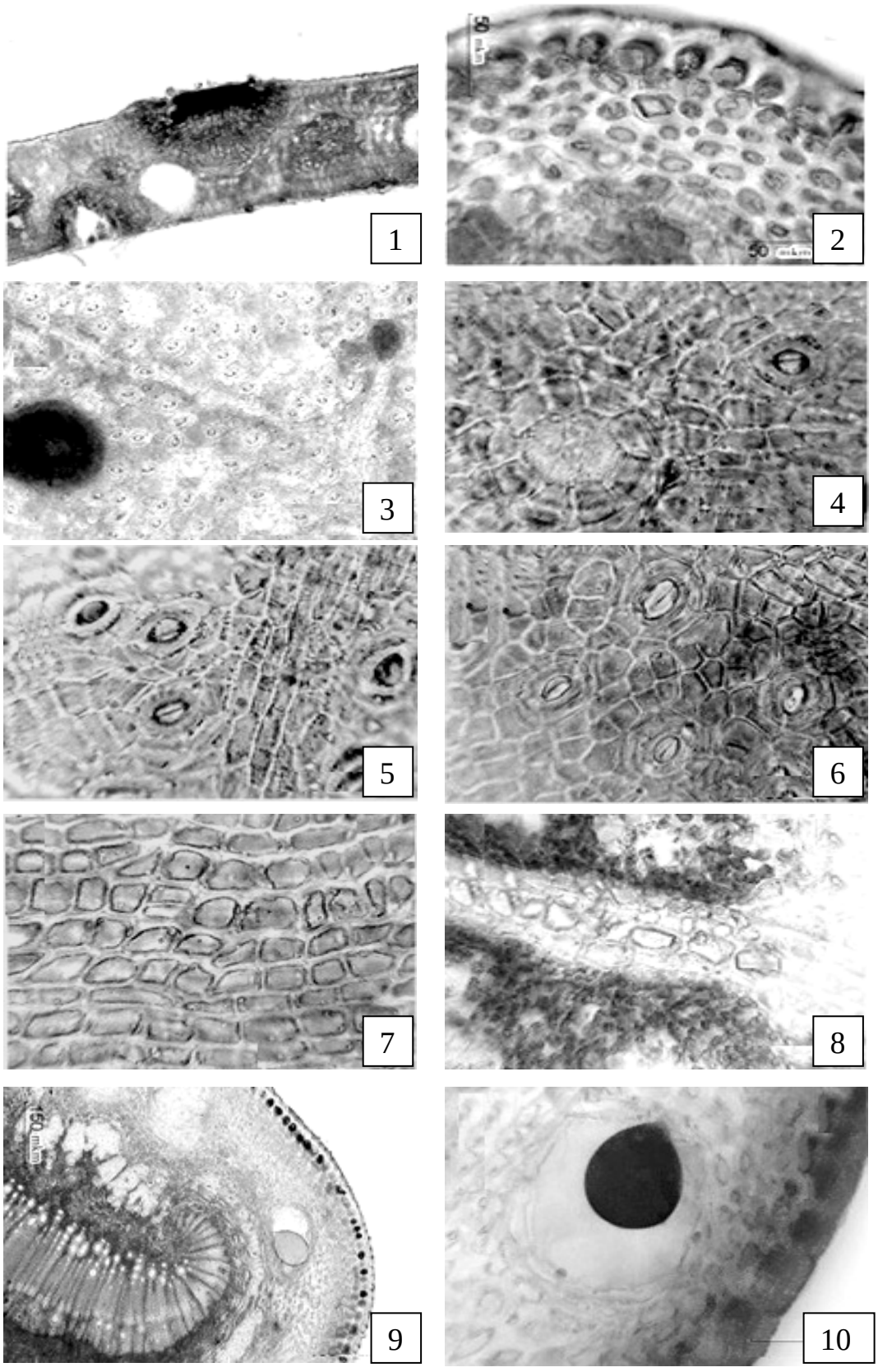


Рисунок 1 – Эвкалипта прутовидного листья
1 – поперечный срез листа: фрагмент с пробковым пятном на поверхности листа (100×); 2 – поперечный срез листа: колленхима края листа (400×); 3 – верхний эпидермис с пробковым пятном на поверхности (100×); 4 – верхний эпидермис с просвечивающим под эпидермисом эфиро-масличным вмести-

лищем (400×); 5 – верхний эпидермис с устьицами (400×); 6 – нижний эпидермис с устьицами (400×); 7 – нижний эпидермис центральной жилки (400×); 8 – кристаллоносная обкладка жилки (400×); 9 – фрагмент коровой части черешка (поперечный срез) (100×); 10 – фрагмент поперечного среза листа с эфиромасличным вместилищем с каплей эфирного масла (400×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов

Раствор стандартного образца (СО) судана красного G. Около 0,0025 г судана красного G растворяют в 10 мл спирта 96 %. Раствор годен в течение 6 мес при хранение в прохладном, защищенном от света месте.

Анисового альдегида раствор спиртовой сернокислый (2). 0,5 мл анисового альдегида смешивают с 10 мл уксусной кислоты ледяной, 85 мл спирта 96 %, прибавляют 5 мл серной кислоты концентрированной и перемешивают. Раствор годен в течение 1 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 2,0 г измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл толуола и взбалтывают в течение 10 мин, затем толуольное извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором наносят в виде полосы длиной 10 мм и шириной не более 2 мм 5 мкл (0,005 мл) испытуемого раствора и параллельно 3 мкл (0,003 мл) раствора СО судана красного G. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, выложенную изнутри фильтровальной бумагой, предварительно насыщенную в течение 1 ч смесью растворителей толуол - этилацетат (90:10), и хроматографируют восходящим способом.

Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, опрыскивают анисового альдегида раствор уксуснокислый в спирте

96 %, выдерживают при 100 - 105 °С в течение 3 - 5 мин и сразу просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО судана красного G должна обнаруживаться зона адсорбции красного цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться две зоны адсорбции фиолетового цвета ниже зоны адсорбции СО судана красного G и одна зона адсорбции фиолетового цвета выше зоны адсорбции СО судана красного G; допускается обнаружение зоны адсорбции темного цвета на линии старта и других зон адсорбции.

Качественная реакция

10,0 мл раствора Б (см. раздел «Количественное определение», сумма фенолальдегидов) выпаривают в фарфоровой чашке на водяной бане досуха, к сухому остатку прибавляют несколько капель свежеприготовленного раствора ванилина в серной кислоте концентрированной должно наблюдаться красно-коричневая окрашивание (терпеноиды).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 14 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 5 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 2 %.

Измельченность сырья. *Измельченное сырье***.** Частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм, не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, не более 5 %;

Посторонние примеси

Сырье, изменившее окраску (потемневшее и почерневшее). *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3 %.

Другие части растения (веточек, бутонов, плодов). *Цельное сырье, измельченное сырье* - не более 2 %.

***Органическая примесь**. Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 0,5 %.

***Минеральная примесь**. Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье.* Эфирного масла не менее 1 %; суммы фенолальдегидов в пересчете на эвкалимин не менее 2 %; *Измельченное сырье.* Эфирного масла не менее 0,8 %; суммы фенолальдегидов в пересчете на эвкалимин не менее 2 %.

Эфирное масло.

Определение содержания эфирного масла проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1 или 2, из 10,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, время перегонки 1 ч).

Сумма фенолальдегидов.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл спирта 95 %, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане при температуре (70 – 80) °С, периодически перемешивая, в течение 1 ч. После охлаждения до комнатной температуры извлечение фильтруют через бумажный фильтр. Фильтр промывают 5 мл спирта 95 % и тщательно перемешивают (испытуемый раствор А).

Раствор А количественно переносят в делительную воронку вместимостью 200 мл, добавляют 20 мл гексана и взбалтывают, после расслоения гексановую фазу отделяют в сухую мерную колбу вместимостью 50 мл, извлечение повторно экстрагируют два раза порциями по 20 и 10 мл гексана, отделяют гексановые фазы, объединяют их с первой фракцией в мерной колбе, доводят объем раствора гексаном до метки и перемешивают (испытуемый раствор Б).

1,0 мл раствора Б переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора гексаном до метки и тщательно перемешивают (испытуемый раствор В).

Оптическую плотность испытуемого раствора В измеряют на спектрофотометре при длине волны 278 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения. В качестве раствора сравнения используют гексан.

Содержание суммы фенолальдегидов в пересчете на эвкалимин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 50 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 250000}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где, А – оптическая плотность испытуемого раствора В;

$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения эвкалимина при длине волны 278 нм, равный 417;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Примечание. Содержание эфирного масла определяют в сырье, предназначенном для получения водных, водно-спиртовых и спиртовых извлечений.

Содержание суммы фенолальдегидов в пересчете на эвкалимин определяют в сырье, предназначенном для получения водно-спиртовых, спиртовых извлечений.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Элеутерококка колючего корневища и корни **ФС.2.5.0053.15**

Eleutherococci senticosi rhizomata et radices

Собранные осенью, тщательно очищенные от земли, разрубленные на куски и высушенные корневища и корни дикорастущего кустарника элеутерококка колючего–*Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim., сем. аралиевых – *Araliaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки.*Цельное сырье.* Куски корневищ и корней, цельные или расщепленные вдоль, длиной до 8 см, толщиной до 4 см, деревянистые, твердые, прямые или изогнутые, иногда разветвленные. Кора тонкая, плотно прилегает к древесине.Корневища с поверхности гладкие или слабо-продольно-морщинистые с пазушными почками и следами отмерших стеблей и обломанных корней.Поверхность корней более гладкая со светлыми поперечными бугорками.Излом длинноволокнистый, светло-желтого или бледно-коричневого цвета. Корневища с поверхности светло-коричневые, корни – более темные.Запах слабый, характерный.Вкус водного извлечения слегка жгучий.

Измельченное сырье. Кусочки корневищ и корней различной формы, светло-желтого или кремового цвета с коричневыми вкраплениями, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 5 мм. Запах слабый, характерный.Вкус водного извлечения слегка жгучий.

Порошок. Кусочки корневищ и корней различной формы, светло-желтого или кремового цвета с коричневыми вкраплениями, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Запах слабый, характерный.Вкус водного извлечения слегка жгучий.

Микроскопические признаки.*Цельное сырье.* При рассмотрении поперечного среза корневища или корня должна быть видна перидерма с многослойной коричневой пробкой, среди крупных клеток паренхимы коры, содержащих друзы оксалата кальция, расположены секреторные каналы, лубяные волокна и сердцевинные лучи. Сердцевинные лучи многорядные, как правило, шириной в 2–3 клетки, в древесине – прямые, в коре – извилистые. Клетки центральной части сердцевинных лучей, расположенных в коре, нередко содержат мелкие друзы оксалата кальция. Кора отделена от древесины слоем камбия. Древесина широкая, как правило, кольцесосудистая.

Секреторные каналы многочисленные, выстланы 4–5 эпителиальными клетками, просветы их заполнены коричневым или оранжево-коричневым содержимым. В корне каналы мелкие, диаметр каналов не меняется по всей ширине коры. В корневище каналы 2 типов: более крупные каналы располагаются на границе феллодермы и лубяной части коры, мелкие (как у корня)–находятся в лубяной части коры.

Лубяные волокна с толстыми одревесневшими стенками располагаются, как правило, группами.

В клетках паренхимы коры должны быть видны многочисленные друзы оксалата кальция; крахмальные зерна содержатся только в клетках паренхимы, окружающих секреторные каналы, и в клетках сердцевинных лучей (в отличие от других представителей семейства Аралиевых, у которых крахмальные зерна заполняют все клетки паренхимы коры).

Древесина состоит из крупных сосудов и склеренхимных волокон (либриформ). Клетки сердцевинных лучей, реже –либриформа, заполнены крахмальными зернами, могут быть видны капли эфирного масла.

Корневище, в отличие от корня, имеет сердцевину, состоящую из крупных неодревесневшихпаренхимных клеток.

Измельченное сырье и порошок. При рассмотрении «давленого» микропрепарата должны быть видны группы сетчатых сосудов с окаймленными порами, редко – фрагменты спиральных сосудов; многочисленные склеренхимные волокна с внутренними перегородками; фрагменты сердцевинных лучей в виде групп округлых клеток с утолщенными пористыми стенками; лубяные волокна с толстыми одре-весневшими пористыми стенками; группы паренхимных клеток, содержащих друзы оксалата кальция; фрагменты коры с секреторными каналами в виде коричневых или желтовато-коричневых трубок; фрагменты пробки, состоящей из крупных клеток с утолщенными стенками; часто в клетках либриформа и сердцевинных лучей видны капли эфирного масла.

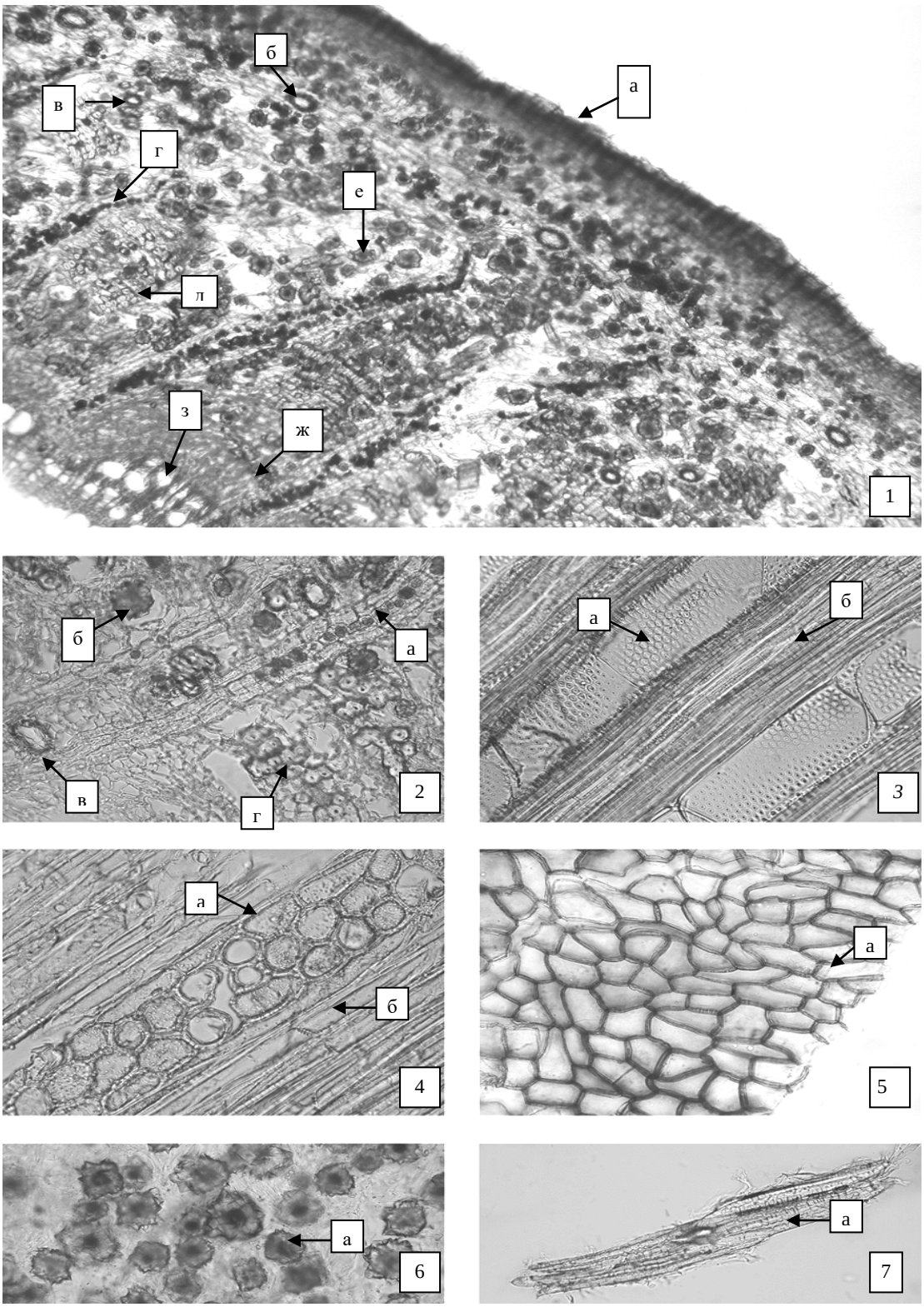


Рисунок – Элеутерококка колючего корневища и корни.
1 – фрагмент поперечного среза корневища: а – многослойная пробка, б – крупный секреторный канал на границе феллодермы и лубяной части коры, в – мелкий секреторный канал в лубяной части коры, г – извилистый сердцевинный луч, д – группы лубяных волокон, е– друзы оксалата кальция, ж – камбий, з – сосуды ксилемы (30×);2 – фрагмент лубяной части коры поперечного среза корневища: а – сердцевинный луч, б – друзы оксалата кальция, в – мелкие секреторные каналы, г – группы лубяных волокон

(200×);3 – фрагмент продольно-тангентального среза древесины корневища: а – сетчатые сосуды с окаймленными порами, б – склеренхимные волокна (200×); 4 – фрагмент продольно-тангентального среза древесины корневища: а – сердцевинный луч, б – склеренхимные волокна (200×); 5 – «давленый» препарат: а – фрагмент пробки, состоящей из крупных клеток с утолщенными стенками (200×); 6 – "давленый" препарат: а – паренхимные клетки с друзами оксалата кальция (200×);7 – «давленый» препарат: а – группа склеренхимных волокон коры с утолщенными пористыми стенками (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

1. ***Тонкослойная хроматография***

Около 2,5 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 15 мл смеси спирт 96 % – вода (1:1) и нагревают с обратным холодильником на водяной бане в течение 30 мин. После охлаждения до комнатной температуры полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 20 мкл испытуемого раствора и 10 мкл раствора стандартного образца (СО) элеутерозида В (см. раздел «Количественное определение –«Элеутерозида В», раствор А).Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре в течение 5 мин, затем помещают в камеру (выложенную изнутри фильтровальной бумагой), предварительно насыщенную в течение 30 мин смесью растворителей хлороформ – метанол– вода (70:30:4), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80–90 % длины пластинки от линии старта, пластинку вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей в вытяжном шкафу.

Пластинку обрабатывают серной кислоты раствором спиртовым 10 %, нагревают в сушильном шкафу при 100–105 °С в течение 2–3 мин и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО элеутерозида В должна обнаруживаться зона адсорбции серого или серого с фиолетовым оттенком цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться (снизу вверх от линии старта): 2 ярко выраженные зоны адсорбции темно-серого цвета; зона адсорбции серо-коричневого цвета, зона адсорбции серого или серого цвета с фиолетовым оттенком на уровне зоны адсорбции СО элеутерозида В; допускается обнаружение дополнительных слабовыраженных зон адсорбции серого, серого с фиолетовым оттенком или коричневого цвета (элеутерозиды).

2. ***Высокоэффективная жидкостная хроматография***

Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора, полученногопри количественном определении (см. раздел «Количественное определение –«Элеутерозида В»), должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме раствора СО элеутерозида В.

3. ***Качественные реакции***

В коническую колбу вместимостью 25 мл помещают 0,5 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, прибавляют 10 мл горячей воды, нагревают на плитке в течение 5 мин и фильтруют. К 1 мл полученного извлечения прибавляют несколько капель железа(III) хлорида раствора 1 %, появляется зелёное окрашивание (полифенольные соединения).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* –не более 14 %.

Зола общая. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* –не более 8 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* –не более 1 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %. *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Остатки стеблей, в том числе отделенные при анализе.*Цельное сырье* –не более 1,5 %.

Потемневшие в изломе корневища и корни.*Цельное сырье* –не более 3 %.

Органическая примесь.*Цельное сырье,измельченное сырье* **–**не более 1 %.

Минеральная примесь.*Цельное сырье,измельченное сырье,порошок* **–**не более 1 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение.*Цельное сырье, измельченное сырье, порошок:*суммы элеутерозидов в пересчете на элеутерозид В–не менее 0,3 %; элеутерозида В –не менее 0,03 %.

Элеутерозид В

Приготовление растворов.

Раствор СО элеутерозида В. Около 10,0 мг (точная навеска) СО элеутерозида В растворяют в спирте 96 % в мерной колбе вместимостью 50 мл, доводят объем раствора смесью спирт 96 % – вода (1:1, о/о) до метки и перемешивают(раствор А).

5,0 мл раствора А переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора смесью спирт 96 % – вода (1:1, о/о) до метки и перемешивают (раствор В).

Срок годности растворов не более 3 мес при хранении в плотно укупоренной таре в прохладном, защищенном от света месте.

*Приготовление раствора фосфорной кислоты концентрированной в воде.*Смешивают фосфорную кислоту концентрированную с водой для хроматографии в объемном соотношении (0,5:99,5). Приготовленный раствор фильтруют под вакуумом через мембранный фильтр с порами размером не более 0,45 мкм.

Проверка пригодности хроматографической системы.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- фактор асимметрии пика элеутерозида В должен находиться в пределах от 0,8 до 1,5;
- эффективность хроматографической колонки должна быть не менее 5000 теоретических тарелок.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм. Около 2,5 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл смеси спирт 96 %–вода (1:1) и нагревают с обратным холодильником на водяной бане в течение 30 мин. После охлаждения извлечение осторожно (без перемешивания) фильтруют через ватный тампон средней плотности, избегая попадания частиц на вату, в мерную колбу вместимостью 100 мл. Извлечение повторяют дважды, используя каждый раз 25 мл смеси спирт 96 %–вода (1:1), при этом ватный тампон для фильтрования не меняют. Объем извлечения в мерной колбе доводят смесью спирт 96 %–вода (1:1, о/о) до метки, одновременно промывая остаток сырья в колбе, и перемешивают.

Около 2–3 мл полученного извлечения фильтруют через нейлоновый фильтр (с размером пор 0,45 мкм), отбрасывая первые 1–2 мл фильтрата (испытуемый раствор).

Условия хроматографирования

Колонка	нержавеющая сталь, 250×4,6 мм, эндкепированныйоктадецилсилилсиликагель (С18) для хроматографии (5 мкм)
Предколонка	соответствует используемой колонке, эндкепированныйоктадецилсилилсиликагель (С18) для хроматографии (5 мкм)
Подвижная фаза	А – раствор фосфорной кислоты концентрированной в воде. В – ацетонитрил для хроматографии.
Способ элюирования	программа градиента

Время, мин	А, об. %	В, об. %
0–5	90	10
5–27	90→80	10→20
27–30	80→50	20→50
30–35	50	50
35–40	50→90	50→10
40–45	90	10

Скорость потока, мл/мин	1,0
Температура колонки, ^{o}C	20 ± 2
Детектор	УФ-спектрофотометрический или диодная матрица
Длина волны, нм	266
Объем вводимой Пробы, мкл	10
Время хроматографирования, мин	30

Хроматографируют попеременно испытуемый раствор и раствор СО, получая не менее 3 хроматограмм. Результаты считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы». Расчет содержанияэлеутерозида В проводят

методом внешнего стандарта.

Содержание элеутерозида Вв абсолютно сухом сырье в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot 5 \cdot 100 \cdot}{S_0 \cdot 50 \cdot 100 \cdot a \cdot} \frac{100 \cdot 100 \cdot}{(100 - W) \cdot} \frac{P}{100} = \frac{S \cdot a_0 \cdot 10 \cdot P}{S_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где *S*– площадь пика элеутерозида В на хроматограмме испытуемого раствора;

S_o–площадь пика элеутерозида В на хроматограмме раствора СО элеутерозида В;

a – навеска сырья, мг;

a_o– навеска СО элеутерозида В, мг;

P– содержание основного вещества в СО элеутерозидаВ,%;

W– влажность сырья, %.

Сумма элеутерозидов

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл и проводят фракционное извлечение последовательно 2 раза спиртом 70 % и 2 раза спиртом 96 % порциями по 20 мл. Каждое извлечение проводят на магнитной мешалке при нагревании до температуры не выше 50 °С в течение 1 ч. Извлечения фильтруют через бумажный фильтр в круглодонную колбу вместимостью 100 мл и отгоняют спирт на роторном испарителе под вакуумом досуха. К сухому остатку в колбе прибавляют 10 мл воды и 10 мл углерода тетрахлорида. Содержимое колбы тщательно перемешивают и количественно переносят в делительную воронку вместимостью 100 мл. Колбу дважды промывают углерода тетрахлоридом порциями по 5 мл и смывы присоединяют к содержимому в делительной воронке. Затем в колбу прибавляют 10 мл смеси хлороформ–спирт 96 % (5:1), перемешивают и оставляют на 10 мин.

В делительной воронке проводят очистку водной фазы трехкратным извлечением углеродатетрахлоридом порциями по 10 мл, отбрасывая каждый раз слой углерода тетрахлорида. К очищенной водной фазе в делительной

воронке прибавляют 20 мл смеси хлороформ–спирт 96 %(5:1) (из них 10 мл из колбы для отгона) и извлекают элеутерозиды в течение 5 мин. Нижний слой фильтруют через бумажный фильтр, содержащий2,0 г натрия сульфата безводного, в мерную колбу вместимостью 100 мл. Извлечение элеутерозидов в делительной воронке повторяют еще 4 раза той же смесью последовательно порциями 15, 15, 10 и 10 мл, собирая извлечения в ту же мерную колбу. Объем раствора в колбе доводят смесью хлороформ – спирт 96 % (5:1) до метки и перемешивают (раствор А).

20,0 мл раствора Апомещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора смесью хлороформ – спирт 96 % (5:1) до метки и перемешивают (раствор Б).

Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре в при длине волны 278 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют смесь хлороформ – спирт96 % (5:1).

Содержание суммы элеутерозидов в пересчете на элеутерозид Ви абсолютно сухое сырье в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 50 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 20 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 25000}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где *A*– оптическая плотность испытуемого раствора Б;

$A_{1см}^{1\%}$ –удельный показатель поглощения элеутерозида В при длине волны 278 нм, равный 302;

1,42 – коэффициент пересчета на сумму элеутерозидов;

a– навеска сырья, г;

W– влажность сырья, %.

Примечание. Определение суммы элеутерозидов в пересчете на элеутерозид В проводят для сырья, предназначенного для производства экстрактов.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Эрвы шерстистой трава **ФС.2.5.0054.15**

Aervaelanataeherba

Собранная в фазу цветения – начала плодоношения высушенная трава культивируемого растения эрвышерстистой –*Aervalanata* (L.) Juss., сем. амарантовых –*Amaranthaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки.*Цельное сырье.*Куски олиственных стеблей с соцветиями, куски олиственных стеблей часто с корнями,отдельные цельные или частично измельченные листья, соцветия и корни, отдельные цельные цветки, плоды, семена.

Стебли цилиндрические, диаметром до 1 см, со слабовыраженными более светлыми ребрышками, опушенные. На изломе видна белая губчатая сердцевина.

Листья короткочерешковые, яйцевидные или эллиптические, на верхушке заостренные или тупые, цельнокрайние, опушенные (снизу более интенсивно), длиной до 2,5 см, шириной до 1,5 см. Соцветие колосовидное, войлочно-опушенное. Цветонос усажен мелкими пленчатыми прицветными листочками широкоовальной формы с остевидным выростом на верхушке. Цветки мелкие невзрачные, цилиндрические или слегка колокольчатые с простым пленчатым околоцветником из сухих беловато-зеленых листочков эллиптической формы; 5 тычинок с двугнездными пыльниками.

Завязь верхняя, пестик с коротким столбиком и двухлопастным рыльцем. Плод – односемянная коробочка. Семена бобовидные, черные,

блестящие, очень мелкие (около 1 мм).

Корни стержневые, с боковыми ответвлениями тонких придаточных корней. Поверхность главного корня продольно-морщинистая, боковых ответвлений – почти гладкая.

Цвет стеблей серовато-зеленый, нередко с желтоватым оттенком, с продольными более светлыми ребрами. Цвет листьев зеленый или желтовато-зеленый, снизу более светлый; цветков – беловато-зеленый или зеленовато-серый, плодов – от зеленого до светло-коричневого; корней – снаружи беловато-серый или беловато-желтый, на изломе – белый.

Запах слабый.Вкус водного извлечения горьковатый с ощущением слизистости.

*Измельченное сырье.*Кусочки листьев, стеблей, соцветий, корней, цельные семена, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 5 мм. Цвет зеленовато-серый с зелеными, светло-коричневыми, беловато-желтыми и редко белыми вкраплениями.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) должны быть видны: стебли цилиндрические, со слабо выраженными более светлыми ребрышками, опушенные; листья которкочерешковые, яйцевидные или эллиптические, на верхушке заостренные или тупые, цельнокрайние, опушенные, зеленые с верхней стороны и светло-зеленые с нижней; соцветия колосовидные и отдельные цветки невзрачные, мелкие цилиндрические или слегка колокольчатые с простым пленчатым околоцветником из 4-5 листочков эллиптической формы, войлочно-опушенные, беловато-зеленые или светло-зеленые; корни продольно-морщинистые, с немногочисленными боковыми ответвлениями, беловато-серые, на изломе белые; плоды односемянная коробочка и отдельные бобовидные семена, очень мелкие, черные, блестящие.

Запах слабый.Вкус водного извлечения горьковатый с ощущением слизистости.

Микроскопические признаки.*Цельное, измельченное сырье.* При рассмотрении микропрепаратов листа с поверхности должны быть видны мелкие клетки эпидермиса с прямыми или слегка извилистыми стенками с верхней стороны листа, с более извилистыми стенками – с нижней стороны листа; устьица на обеих сторонах листа (с нижней – многочисленные, с верхней – редкие) окружены 3–5 клетками эпидермиса (аномоцитный тип); в мезофилле многочисленные крупные друзы оксалата кальция. Жилки многочисленные, хорошо заметные, состоящие из коротких извилистых трахеид. На поверхности эпидермиса многочисленные простые многоклеточные волоски, состоящие из нескольких коротких клеток основания с гладкими стенками, и 2–5 длинных и более или менее извилистых конечных клеток, оболочки которых имеют узкие шиповидные выросты. Сочленение клеток волосков характерное – зубчатое.

Клетки эпидермиса стебля над ребрами удлиненно-вытянутые с волосками (главным образом на верхних участках стебля) или только с их многоклеточными основаниями; клетки эпидермиса стебля в ложбинках между ребрами округло-многоугольные или вытянутые с устьицами характерного строения. Листочки околоцветника и прицветники пленчатые, клетки эпидермиса по краю – удлиненно-вытянутые, в средней части листочков имеется небольшой участок мезофилла, в прицветниках верхушка состоит из узких клеток, выступающих над пленчатой окраиной в виде ости; поверхность листочков покрыта многочисленными волосками такого же строения, как и на листьях. Пыльца мелкая, округлая, с 6 порами и гладкойэкзиной. В стебле и черешке листа встречаются очень крупные друзы оксалата кальция.

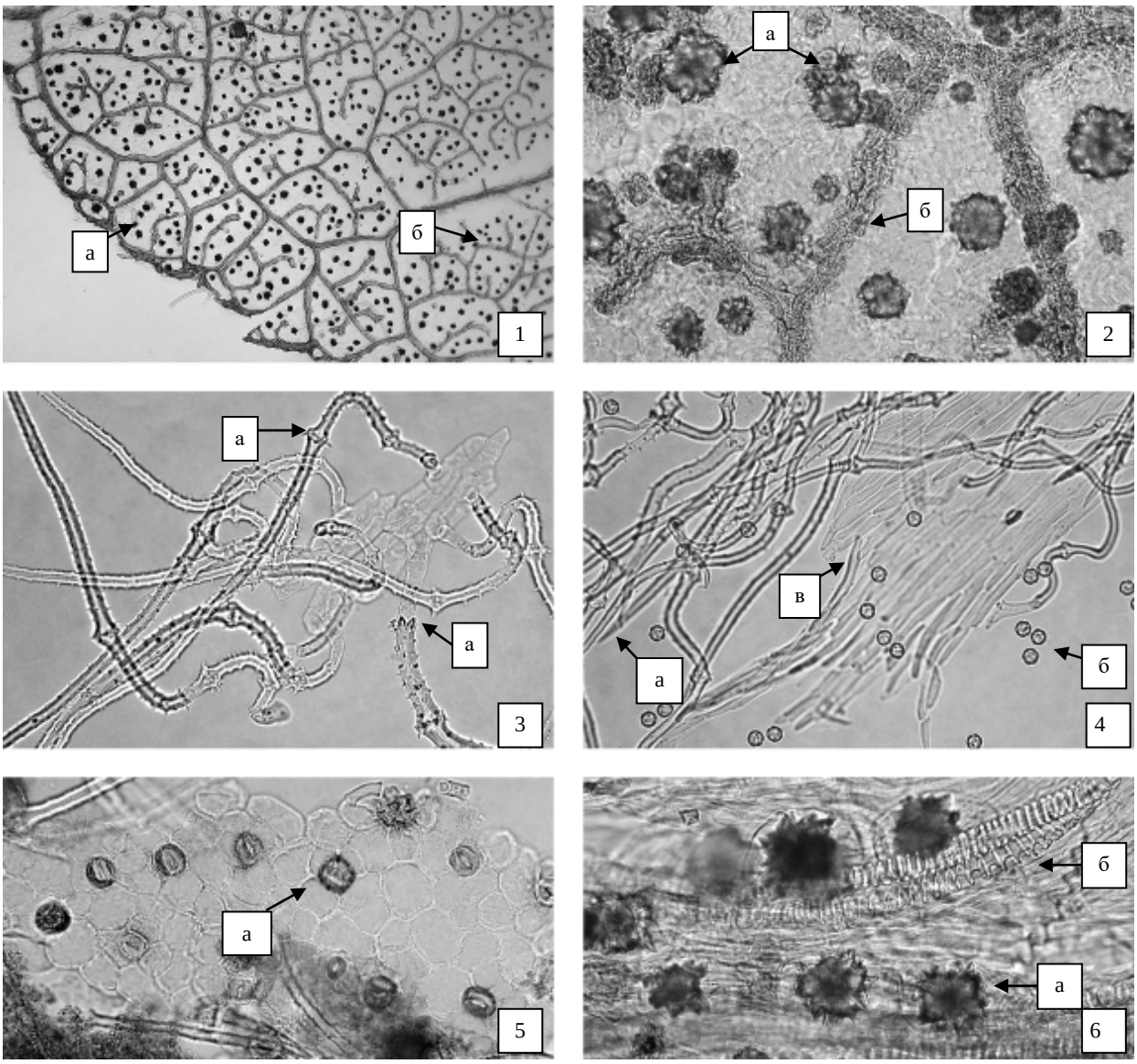


Рисунок –Эрвы шерстистой трава.

1 – фрагмент листовой пластинки: а – многочисленные друзы оксалата кальция, б – жилки (40×); 2 – фрагмент листовой пластинки: а – крупные друзы оксалата кальция, б – жилки (200×); 3 – фрагмент эпидермиса: а – волоски с характерным зубчатым сочленением (200×); 4 – фрагмент цветка: а – волоски, б – пыльца, в – пленчатый листочек околоцветника (200×);5 – фрагмент эпидермиса с устьицамианомоцитного типа (а) (200×);6 – фрагмент черешка: а – клетки с крупными друзами, б – спиральные сосуды (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов

Раствор стандартного образца (СО) рутина. Около 0,005 г СО рутина (рутина тригидрата) растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок

годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор СО кверцетина. Около 0,005 г СО кверцетина (кверцетина дигидрата) растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около 1,0 г сырья, измельченного до величинычастиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 15 мл спирта 80 % и кипятят с обратным холодильником на водяной бане в течение 10 мин. После охлаждения до комнатной температуры извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 40 мкл испытуемого раствора и в одну полосу по 5 мкл растворов СО рутина и СО кверцетина. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 30 мин смесью растворителей этилацетат–муравьиная кислота безводная–вода (12:2,5:3), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей. Пластинку выдерживают в сушильном шкафу при 100–105 °Св течение 3–5 мин, еще теплую обрабатывают последовательно дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира раствором 1% в спирте 96 % и макрогола 400 раствором спиртовым 5 %. Через 30 мин после обработки пластинку просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме растворовСО рутина и СО кверцетина должны обнаруживаться: зона адсорбции с флуоресценцией желтого, желто-оранжевого или оранжевого цвета (рутин) и над ней зона адсорбции с флуоресценцией желтого, желто-оранжевого или оранжевого цвета (кверцетин).

На хроматограмме испытуемого раствора должно обнаруживаться не менее 4 флуоресцирующих зон адсорбции: ниже зоны адсорбции СО рутина зона адсорбции желтого, зелено-желтого, желто-оранжевого или оранжевого цвета, над ней зона адсорбции зеленого или зелено-желтого цвета, ниже или почти на уровне зоны адсорбции СО рутина зона адсорбции голубого цвета, между зонами адсорбции СО рутина и СО кверцетина зона зеленого или зелено-желтого цвета; допускается обнаружение дополнительных зон адсорбции (флавоноиды).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье,измельченное сырье* – не более 12 %.

Зола общая. *Цельное сырье,измельченное сырье* – не более 15 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье,измельченное сырье* – не более 8 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:*частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, –не более 5 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм, –не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,25 мм,–не более 5 %.

Посторонние примеси

Части сырья, изменившие окраску.*Цельное сырье*–не более 3 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье,измельченное сырье* – не более 3 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье,измельченное сырье* – не более 1 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье,измельченное сырье:*суммы флавоноидов в пересчете на рутин –не менее 0,5 %.

Приготовление растворов.

Раствор СО рутина. Около 0,05 г (точная навеска) СО рутина, предварительно высушенного при температуре 130 – 135 ºС в течение 3 ч, растворяют в 50 мл спирта 96 % в мерной колбе вместимостью 100 мл при нагревании на водяной бане, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор А СО рутина).Срок годности раствора Ане более 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

1,0 мл раствора А СО рутина,2 мл алюминия хлорида раствора 2 % *в* спирте 60 %и 0,1 мл уксусной кислоты разведенной 30 % в спирте 60 %, доведенного спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл (раствор Б СО рутина).

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих через сито с отверстиями размером 1 мм.Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырьяпомещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл спирта 60 %, колбу взвешивают с погрешностью ± 0,01 г, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане в течение 60 мин, периодически перемешиваютсодержимое. Колбу охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и при необходимости доводят объем раствора спиртом 60 % до первоначального. Около 40 мл полученного извлечения переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочный раствор осторожно (без перемешивания) фильтруют

через бумажный складчатый фильтр, отбрасывая первые 15 мл фильтрата (раствор А испытуемого раствора).

2,0 мл раствора А испытуемого растворапомещаютв мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл алюминия хлорида раствора 2 % в спирте 60 %, доводят объем раствора спиртом 60 % до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора).

Оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора измеряют через 40 мин на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2,0 мл растворАА испытуемого раствора, 0,1 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, доведенный спиртом 60 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО рутина: 1,0 мл раствора А СО рутина, 2 мл алюминия хлорида раствора 2 % в спирте 60 % и доведенный спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл. В качестве раствора сравнения используют: 1 мл раствора А СО рутина, 0,1 мл уксусной кислоты разведенной 30 % и доведенный спиртом 60 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 25 \cdot a_0 \cdot 1 \cdot P \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 2 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot a_0 \cdot P \cdot 25}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)}$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
A_o – оптическая плотность раствора Б СО рутина;
a – навеска сырья, г;
a_o – навеска СО рутина, г;
P – содержание основного вещества в СО рутина, %;
W – влажность сырья, %.

Допускается содержание суммы флавоноидов в пересчете нарутин вычислять с использованием удельного показателя поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридомпо формуле:

$$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 2 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 62500}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где*A*– оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;

$A_{1см}^{1\%}$ –удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при длине волны 410нм, равный 248;

a – навеска сырья, г;

W– влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Эхинацеи пурпурной трава **ФС.2.5.0055.15**

Echinaceae purpureae herba

Собранная в период начала цветения высушенная трава многолетнего культивируемого травянистого растения эхинацеи пурпурной – *Echinacea purpurea* (L.) Moench., сем.астровых – *Asteraceae.*

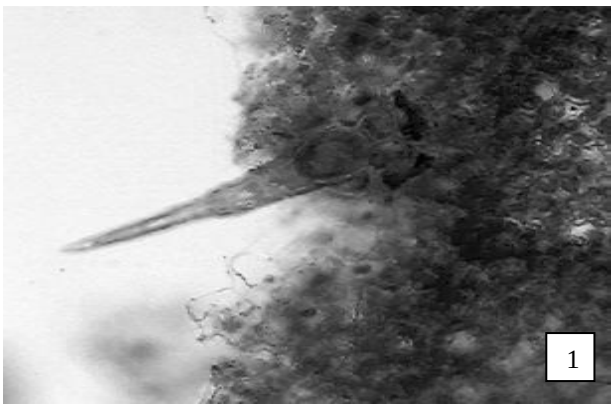
ПОДЛИННОСТЬ

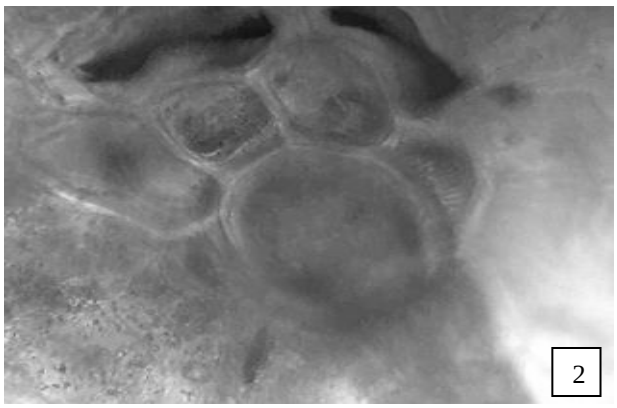
Внешние признаки.*Цельное сырье.*Смесь цельных или частично измельченных кусков стеблей, листьев, цветочных корзинок, цветков, бутонов, реже незрелых плодов. Стебли цилиндрические, ребристые, голые, диаметром до 1 см. Листья черешковые, продолговато-яйцевидные или ланцетные, остроконечные, неравнокрупнозубчатые, реже цельнокрайние, с 5–3 продольными жилками, жесткие, шероховатые от короткощетинистогоопушения. Цветочные корзинки с выпуклым, полым, густоусаженным прицветниками цветоложем. Обертка блюдцевидная, трехрядная; листочки обертки черепитчато-расположенные, ланцетные, остроконечные, отогнутые, опушенные с внешней стороны, голые по краям. Прицветники узколанцетные, с шиловидным окончанием, превышающие по длине трубчатые цветки. Краевые цветки язычковые, длиной до 6 см, пестичные, бесплодные, с двух-, трехзубчатым отгибом, снаружи опушенным. Срединные цветки трубчатые, обоеполые, с пятизубчатым венчиком. Плод – семянка обратнопирамидальная, четырехгранная, к основанию суженная, с хохолком в виде короны с неравномерными зубчиками.

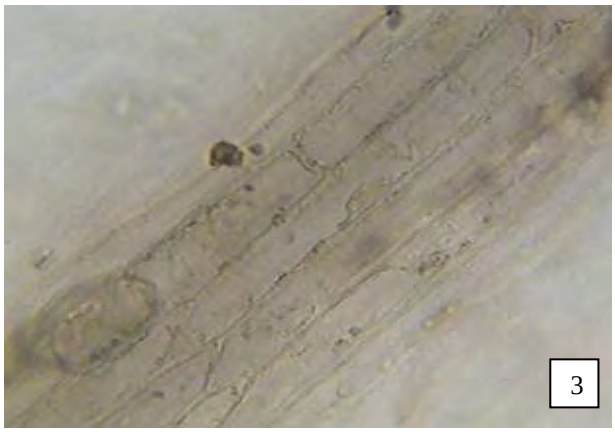
Цвет стеблей зеленый, иногда с малиновыми или пурпурными пятнами;

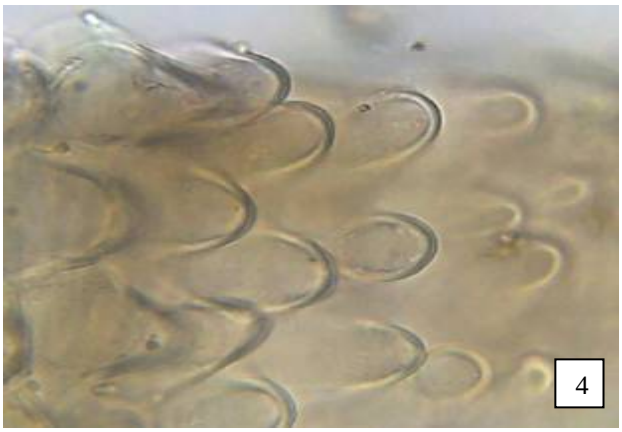
листьев – зеленый; цветков – малиновый или пурпурный; плодов – зеленый или зеленовато-коричневый. Запах слабый. Вкус водного извлечения слегка горьковатый.

Микроскопические признаки.*Цельное сырье.*При рассмотрении листа с поверхности видны клетки эпидермиса с извилистыми стенками. Устьица овальные, окружены 2–6 околоустьичными клетками (аномоцитный тип), расположены на обеих сторонах листовой пластинки, на нижней их больше. Над жилками и вдоль них вытянуты прямостенныеклетки эпидермиса. По жилкам и по краю листа встречаются простые длинные одноклеточные волоски и простые 2–4- клеточные волоски со спавшейся конечной клеткой, часто опадающей; простые 1–4-клеточные волоски, иногда с заметным утолщением стенок; изредка встречаются железистые волоски, состоящие из 1–2-клеточной ножки и одноклеточной овальной головки, заполненной желтовато-бурым содержимым. Клетки у основания волосков расположены радиально и образуют розетку. Клетки эпидермиса язычкового и трубчатого цветков со слабоизвилистыми, над жилками – с прямыми стенками, устьица мелкие, овальные, погруженные, окружены 4–6 околоустьичными клетками (аномоцитный тип). Простые 2–3-клеточные волоски с острым концом расположены преимущественно по жилкам. Железки состоят из 10–12 выделительных клеток, расположенных в 2 ряда.









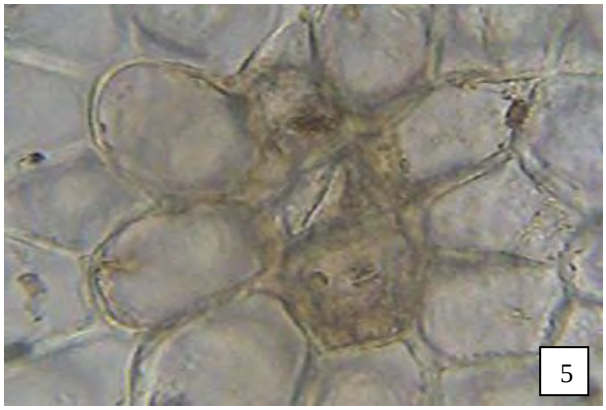


Рисунок – Эхинацеи пурпурной трава

1 – нижний эпидермис листа с простым волоском (100×); 2 – нижний эпидермис листа: клетки у основания волоска в виде розетки (400×); 3 – эпидермис язычкового цветка: клетки верхнего эпидермиса над жилкой (400×); ×); 4 – нижний эпидермис язычкового цветка: сосочковидные клетки (400×); 5 – нижний эпидермис язычкового цветка с устьицем (400×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

*Раствор стандартного образца (СО)цикориевой кислоты.*Около 0,025

г СО цикориевой кислоты растворяют в 25 мл спирта 70 % при нагревании и перемешивают. Срок годности раствора 14 сут.

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором наносят 20 мклиспытуемого раствора (см. раздел «Количественное определение» раствор А) и20 мкл раствора СО цикориевой кислоты. Пластинку с нанесенными пробами сушат, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение1 ч смесью растворителей хлороформ – этанол–вода (26:16:3), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80–90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителейи просматривают в УФ-светепри длине волны 254 нм.

На хроматограмме раствора СО цикориевой кислотыдолжна обнаруживаться темная зона адсорбции.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться темная зона адсорбции на уровне зоны адсорбции СО цикориевой кислоты; допускается обнаружение других зон адсорбции (фенилпропаноиды).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность.*Цельное сырье* – не более 13 %.

Зола общая.*Цельное сырье* – не более 8 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте.*Цельное сырье* – не более 4 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Частисырья,изменившие окраску.*Цельное сырье* – не более 3 %.

Другие части растения.*Цельное сырье* – не более 2 %.

Органическая примесь.*Цельное сырье* – не более 1 %.

Минеральная примесь.*Цельное сырье* – не более 1 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС

«Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды.В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье:* сумма фенилпропаноидов в пересчете на цикориевую кислоту – не менее 2,5 %.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм.Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу с притертой пробкой вместимостью 25 мл, прибавляют 0,1 г щавелевой кислоты, вносят остеклованный магнитный стержень и приливают 10 мл спирта 95 % и взвешиваютс точностью ± 0,01 г. Затем колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают до слабого кипения растворителя при постоянном перемешивании на магнитной мешалке в течение 45 мин. После охлаждения колбу взвешивают, доводят до первоначальной массы спиртом 95 % и перемешивают. Содержимое колбы переносят в центрифужную пробирку вместимостью 25 мл и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 3 мин.

На стартовую линию фильтровальной бумаги размером 15×15 см наносят в 2повторностях полосой не более 3 см по 20 мкл надосадочной жидкости. После высыхания пятен их границы отмечают графитовым карандашом и хроматографируют восходящим методом в хлороформе. Когда фронт растворителя пройдет 5 см, бумагу вынимают из камеры и сушат на воздухе до удаления запаха хлороформа. Отмеченные участки стартовых

пятен вырезают, помещают в колбу со шлифом вместимостью 25 мл, приливают в каждую по 10 мл хористоводороднойкислоты раствора 0,1 М и перемешивают на механическом встряхивателе в течение 30 мин.

Оптическую плотность полученных растворов измеряют на спектрофотометре при длине волны 328 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют хлористоводородной кислоты раствор 0,1 М.

Содержание сумма фенилпропаноидов в пересчете на цикориевую кислоту и абсолютно сухое сырье в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 1 \cdot 10 \cdot 10 \cdot 100 \cdot 100}{A_{\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 0{,}02 \cdot 1000 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 50000}{A_{\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где*A*– оптическая плотность полученных растворов;

$A_{1см}^{1\%}$ –удельный показатель поглощения СО цикориевой кислоты при 328 нм, равный 782;

a – навеска сырья, г;

W– влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Аммиака раствор 10 % + Аниса обыкновенного плодов масло эфирное, раствор для приема внутрь спиртовой
Нашатырно-анисовые капли
раствор для приема внутрь спиртовой
Ammonii solutio 10 % +
Anisi vulgaris fructuum oleum aethereum,
solutio spirituosa ad usum internum
Ammonii hydroxydi et Anisi instillationes,
solutio spirituosa ad usum internum

ФС.3.4.0005.18

Взамен ГФ X ст. 377

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Аммиака раствор 10 % + Аниса обыкновенного плодов масло эфирное (Нашатырно-анисовые капли), раствор для приема внутрь спиртовой, применяемый в качестве лекарственного средства.

Состав

Аниса обыкновенного плодов масло эфирное	- 2,81 г
Аммиака раствора 10 %	- 15 мл
Этанола (спирта этилового) 90 %	- до 100 мл

Описание

Прозрачная бесцветная или слегка желтоватого цвета жидкость с характерным запахом.

Подлинность

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов

Раствор стандартного образца (СО) анетола. Около 0,1 г СО анетола растворяют в 10 мл спирта 95 %. Раствор используют свежеприготовленным.

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 10 мкл (0,01 мл) лекарственного средства и 5 мкл (0,005 мл) раствора СО анетола. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе и помещают в камеру со смесью растворителей толуол – этилацетат (93:7) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, пластинку вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, обрабатывают ванилина раствором в серной кислоте и нагревают при температуре 120 °С в течение 5 мин.

На хроматограмме раствора СО анетола должна обнаруживаться зона адсорбции красновато-желтого цвета.

На хроматограмме испытуемого лекарственного средства должны обнаруживаться от линии старта не менее 4 зон адсорбции синего и фиолетового цвета, зона адсорбции красновато-желтого цвета на уровне зоны адсорбции СО анетола; допускается обнаружение других зон адсорбции.

Качественные реакции

При смешивании 1 г лекарственного средства с 10 мл воды должно наблюдаться образование мутного раствора белого цвета щелочной реакции (индикатор – бумага индикаторная универсальная).

Плотность. Не более не более 0,875. В соответствии с ОФС «Плотность».

***Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» (контролируется в течение технологического процесса).

Объем содержимого упаковки. В соответствии с требованиями ОФС «Масса (объем) содержимого упаковки».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Аммиака - от 1,42 до 1,58 %; аниса обыкновенного плодов масла эфирного – от 2,7 до 3,0 %; суммы ароматических соединений в пересчете на анетол – не менее 2,15 %.

Аммиак

К 3 мл лекарственного средства прибавляют 25 мл воды и титруют 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты (индикатор – метиловый красный).

1 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты соответствует 0,001703 г аммиака.

Аниса обыкновенного плодов масло эфирное

10 мл лекарственного средства помещают в колбу для определения эфирного масла, прибавляют 20 мл серной кислоты разведенной 16 % и 20 мл натрия хлорида насыщенного раствора. Смесь взбалтывают в течение 5 мин, доводят объем жидкости натрия хлорида насыщенным раствором почти до шейки колбы и помещают на 1 ч в сосуд с теплой водой. Затем осторожно добавляют натрия хлорида насыщенный раствор так, чтобы поверхность жидкости достигла середины градуировочной шейки и чтобы слой эфирного масла, собирающийся над жидкостью в колбе, полностью перешел в горлышко колбы. В случае, если капли масла прилипают к стенкам колбы, их переводят в горлышко постукиванием по стенкам колбы, вращением колбы. После полного разделения слоев отсчитывают объем эфирного масла над водной жидкостью.

Содержание аниса обыкновенного плодов масла эфирного в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{V_1 \cdot 0{,}99 \cdot 100}{10 \cdot \rho} = \frac{V_1 \cdot 9{,}9}{\rho},$$

где V_1 – объем выделившегося аниса обыкновенного плодов масла эфирного, мл;

0,99 – средняя плотность аниса обыкновенного плодов масла эфирного;

10 – объем лекарственного средства, мл;

ρ – плотность лекарственного средства.

Ароматические соединения

Приготовление растворов

Раствор стандартного образца (СО) анетола. Около 0,05 г СО анетола помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в спирте 95 %, доводят объем колбы тем же растворителем до метки и перемешивают.

1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

1,0 мл лекарственного средства помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора спиртом 95 % до метки и перемешивают (испытуемый раствор).

Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 257 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения спирт 95 %.

Параллельно в тех же условиях измеряют оптическую плотность раствора СО анетола.

Содержание суммы ароматических соединений в пересчете на анетол в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A_1 \cdot a_0 \cdot 50 \cdot 100 \cdot P}{A_0 \cdot 100 \cdot 100} = \frac{A_1 \cdot a_0 \cdot P}{A_0 \cdot 2},$$

где A_1 – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность раствора СО анетола;

a_0 – навеска анетола, г;

P – содержание анетола в СО, %.

Хранение. В соответствии с ОФС «Хранение лекарственных средств».

Боярышника плодов настойка **ФС.3.4.0001.18**

Crataegi fructi tinctura **Взамен ФС 42-1652-99**

Боярышника плодов настойка, получаемая из плодов дикорастущих и культивируемых кустарников или небольших деревьев разрешенных к медицинскому применению видов растения боярышника *(Crataegus)*, сем. розоцветных – *Rosaceae*, и применяемая в качестве лекарственного препарата.

Для получения настойки используют:

боярышника плодов измельченных - 100 г;

этанола (спирта) 70 % - достаточное количество для получения 1000 мл.

Описание. Прозрачная жидкость от светло-желтого или светло-коричневого до красно-коричневого цвета с характерным запахом.

Подлинность.

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) гиперозида. Около 0,005 г СО гиперозида, предварительно высушенного при температуре от 130 до 135 °С в течение 3 часов, растворяют при нагревании на водяной бане в 10 мл спирта 70 %.

Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор стандартного образца (СО) кверцетина. Около 0,005 г СО кверцетина, предварительно высушенного при температуре от 130 до 135 °С в течение 3 часов, растворяют при нагревании на водяной бане в 10 мл спирта 70 %.

Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор стандартного образца (СО) рутина. Около 0,005 г СО рутина, предварительно высушенного при температуре от 130 до 135 °С в течение 3 часов, растворяют при нагревании на водяной бане в 10 мл спирта 70 %.

Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

20 мл настойки помещают в фарфоровую чашку и выпаривают на водяной бане до удаления запаха спирта. Остаток разбавляют водой до 30 мл, переносят в делительную воронку вместимостью 100 мл, прибавляют 20 мл бутанола и встряхивают в течение 10 мин. Водный (нижний) слой отбрасывают, бутанольный слой переносят в круглодонную колбу и упаривают на кипящей водяной бане с помощью роторного испарителя досуха. Сухой остаток растворяют в 5 мл спирта 96 % (испытуемый раствор).

На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят в виде полос длиной не более 10 мм и шириной не более 2 мм 20 мкл (0,02 мл) испытуемого раствора, рядом - 3 мкл (0,003 мл) раствора СО гиперозида, 3 мкл (0,003 мл) раствора СО кверцетина и 3 мкл (0,003 мл) раствора СО рутина. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 1 ч смесью растворителей бутанол - уксусная кислота ледяная - вода (90 : 10 : 5), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей. Затем пластинку опрыскивают алюминия хлорида раствором 2 % с последующим выдерживанием при температуре 100 – 105 °С в течение 5 мин и просматривают при дневном свете.

На хроматограммах растворов СО гиперозида, СО кверцетина, СО рутина должны обнаруживаться зоны адсорбции желтого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться зоны адсорбции желтого цвета на уровне зон адсорбции СО гиперозида и кверцетина; может обнаруживаться зона адсорбции желтого цвета на уровне зоны адсорбции СО рутина; допускается обнаружение других зон адсорбции.

В УФ-свете (365 нм) на хроматограммах растворов СО гиперозида, СО кверцетина, СО рутина должны обнаруживаться зоны адсорбции с флуоресценцией желтого, зеленовато-желтого или желто-оранжевого цвета.

В УФ-свете (365 нм) на хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться зоны адсорбции с флуоресценцией желтого, зеленовато-желтого цвета на уровне зон адсорбции СО гиперозида и кверцетина; может обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией желтого цвета на уровне зоны адсорбции СО рутина; допускается обнаружение других зон адсорбции.

Спирт этиловый. Не менее 65 %. В соответствии с требованиями ОФС «Определение спирта этилового в лекарственных средствах».

***Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» (контролируется в течение технологического процесса).

Сухой остаток. Не менее 1,0 %. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки».

Тяжелые металлы. Не более 0,001 %. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки».

«**Объем содержимого упаковки**». В соответствии с требованиями ОФС «Настойки».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид должно быть не менее 0,003 %.

Приготовление растворов.

Буферный раствор pH 4,0. 10 мл 1 М раствора натрия гидроксида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 57 мл 1 М раствора уксусной кислоты, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Срок годности раствора 1 мес.

5,0 мл препарата помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 6 мл алюминия хлорида раствора 2 %, помещают на 3 мин в кипящую водяную баню, быстро охлаждают, добавляют 2 мл буферного раствора pH 4,0, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивают (ис-

пытуемый раствор).

Оптическую плотность полученного испытуемого раствора измеряют на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 5 мл препарата, 2 мл буферного раствора pH 4,0, помещенный в мерную колбу вместимостью 25 мл, и доведенного спиртом 70 % до метки.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид в настойке в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 25}{A_{1см}^{1\%} \cdot a}$$

где:

A - оптическая плотность испытуемого раствора;

$A_{1см}^{1\%}$ - удельный показатель поглощения комплекса СО гиперозида с алюминия хлоридом при длине волны 410 нм, равный 380;

a - объем настойки, взятый для определения, мл;

25 – разведение, мл.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки».

Горца перечного (Перца водяного) травы экстракт жидкий
Polygoni hydropiperi herbae extractum liqidum

ФС.3.4.0002.18
Взамен ГФ X ст. 263

Горца перечного (Перца водяного) травы экстракт жидкий, получаемый из травы однолетнего травянистого растения горца перечного (перца водяного) – *Polygonum hydropiper* L. сем. гречишных – *Polygonaceae*, применяемый в качестве лекарственного препарата.

Для получения препарата необходимо:

горца перечного (Перца водяного) травы - 1000 г;

этанола (спирта этилового) 70 % - достаточное количество для получения 1000 мл.

Описание. Прозрачная жидкость зеленовато-коричневого цвета с характерным запахом.

Подлинность.

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) гиперозида. Около 0,005 г СО гиперозида растворяют при нагревании в 10 мл спирта 96 % при нагревании на водяной бане.

Раствор стандартного образца (СО) кверцетина. Около 0,005 г СО кверцетина растворяют при нагревании в 10 мл спирта 96 % при нагревании на водяной бане.

Раствор стандартного образца (СО) рутина. Около 0,005 г СО рутина растворяют при нагревании в 10 мл спирта 96 % при нагревании на водяной бане.

Испытуемый раствор. К 5 мл препарата прибавляют в 15 мл спирта 96 % и перемешивают.

На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля с

флуоресцентным индикатором наносят в виде полос длиной 10 мм и шириной не более 2 мм по 10 мкл (0,01 мл) испытуемого препарата, раствора СО гиперозида, раствора СО кверцетина, раствора СО рутина. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 1 ч системой растворителей этилацетат – бутанон-2 - вода (30:10:5:5), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, обрабатывают сначала дифенилборилоксиэтиламина раствором 1 % в спирте 96 % и полиэтиленгликоля раствором 5 % в спирте 96 %, выдерживают при температуре 100 - 105 °С в течение 2-5 мин и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме испытуемого препарата должны обнаруживаться: зона адсорбции с флуоресценцией желтого, оранжевого или оранжево-зеленого цвета на уровне зоны адсорбции СО кверцетина; две зоны адсорбции с флуоресценцией желтого цвета, одна из которых - на уровне зоны адсорбции СО гиперозида, другая - чуть выше; могут обнаруживаться: зона адсорбции с флуоресценцией желтого цвета на уровне зоны адсорбции СО рутина, зона адсорбции с флуоресценцией от голубого до синего цвета ниже зоны адсорбции СО кверцетина; допускается обнаружение других зон адсорбции.

Спирт этиловый. Не менее 64 %. В соответствии с требованиями ОФС «Определение спирта этилового в лекарственных средствах».

Метанол и 2-пропанол*. Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» (контролируется на стадии технологического процесса).

Сухой остаток. Не менее 2 %. В соответствии с требованиями ОФС «Экстракты».

Тяжелые металлы. Не более 0,01 %. В соответствии с требованиями

ОФС «Экстракты».

К 1 мл препарата прибавляют 1 мл серной кислоты концентрированной, осторожно сжигают и прокаливают. Полученный остаток обрабатывают при нагревании 5 мл аммония ацетатом насыщенным раствором. Фильтруют через беззольный фильтр, промывают 5 мл воды и доводят объем фильтрата водой до 100 мл.

10 мл полученного раствора должны выдерживать испытания на тяжелые металлы.

«**Объем содержимого упаковки**». В соответствии с требованиями ОФС «Экстракты».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на кверцетин в препарате должно быть не менее 0,1 %.

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) кверцетина. Около 0,05 г (точная навеска) СО кверцетина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 20-30 мл спирта 96 % при нагревании на водяной бане, охлаждают, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор А СО кверцетина).

Срок годности раствора 1 месяц.

1,0 мл раствора А СО кверцетина помещают в мерную колбу вместимостью 25, прибавляют 2 мл алюминия хлорида раствора 2 %, 0,05 мл уксусной кислоты разведенной, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б СО кверцетина).

5,0 мл препарата помещают в круглодонную или коническую колбу вместимостью 100 мл, добавляют 30 мл спирта 96 % и 0,3 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, нагревают колбу с обратным холодильником при нагревании на водяной бане в течение 30 мин. Полученный раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл с помощью 15 мл спирта 96 %. После охлаждения до комнатной температуры раствор в колбе доводят до метки тем же растворителем и перемешивают.

1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью

25 мл, прибавляют 2 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 %, 0,05 мл уксусной кислоты разведенной, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (испытуемый раствор).

Через 20 мин измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 430 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения.

В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1,0 мл испытуемого, 0,05 мл уксусной кислоты разведенной, помещенного в мерную колбу вместимостью 25 мл и доведенный спиртом 96 % до метки.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора СО кверцетина в аналогичных условиях относительно раствора сравнения. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1,0 мл раствора А СО кверцетина, 0,05 мл уксусной кислоты разведенной, помещенного в мерную колбу вместимостью 25 мл и доведенный спиртом 96 % до метки.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на кверцетин в препарате в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_o \cdot 50 \cdot 25 \cdot 5 \cdot 1 \cdot P \cdot 100}{A_o \cdot 5 \cdot 1 \cdot 50 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100} =$$

$$= \frac{A \cdot a_o \cdot 0{,}02 \cdot P}{A_o}$$

где

A - оптическая плотность испытуемого раствора;

A_o - оптическая плотность раствор Б СО кверцетина;

P – содержание основного вещества в СО кверцетина, %;

a_o – навеска СО кверцетина, г.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Экстракты».

Какао семян масло жирное **ФС.3.4.0010.18**

Cacao seminis oleum pingue **Взамен ГФ X ст. 474**

Жирное масло, получаемое прессованием поджаренных и освобожденных от кожуры семян культивируемого тропического шоколадного дерева какао - *Theobroma cacao* L., сем. стеркулиевых - Sterculiaceae.

Описание. Плотная однородная масса желтовато-белого цвета со слабым ароматным запахом, хрупкая при температуре ниже 25 °С; масло обладает полиморфизмом.

Подлинность.

Газовая хроматография.

На хроматограмме испытуемого раствора, полученного при количественном определении, должны регистрироваться пики метиловых эфиров жирных кислот: пальмитата, стеарата, олеата, линолеата, линолената (при присутствии) и арахидата с относительными временами удерживания 1,0; 1,55; 1,60; 1,72; 1,89 и 2,30 соответственно.

Растворимость. Легко растворимо в эфире и хлороформе, растворимо в кипящем этаноле, мало растворимо в этаноле 96 %.

Плотность. От 0,960 до 0,974 г/см^3 (при 20 °С). В соответствии с требованиями ОФС «Плотность».

Температура плавления. От 31 до 35 °С. В соответствии с требованиями ОФС «Температура плавления».

Субстанцию расплавляют при температуре от 50 до 60 °С. Около 50 г расплавленной субстанции помещают на водяную баню и охлаждают при температуре 25 °С при постоянном перемешивании до получения

пастообразной консистенции, избегая попадания пузырьков воздуха. Субстанцию выдерживают на водяной бане при температуре от 32 ° до 33 °С до тех пор, пока она не достигнет температуры водяной бани и не приобретет консистенцию жидкого крема (около 30 мин). Субстанцию переливают в другой стакан и дают массе застыть при комнатной температуре в течение не менее 2 ч. В затвердевший образец вдавливают один конец U-образной капиллярной трубки, диаметром 1,5 мм, длиной около 80 мм и расстоянием около 10 мм между обоими капиллярами. Затем с помощью подходящего средства прикрепить другой рукав U-образной трубки к точному термометру (имеющему градуировку 0,1 °С) таким образом, чтобы сгиб U-образной трубки находился на уровне термочувствительного элемента термометра. Внести термометр в водяную баню таким образом, чтобы верхняя часть материала находилась на уровне не менее 20 мм ниже поверхности и провести нагревание (в соответствии с требованиями ОФС «Температура плавления», метод 1). Когда температура достигнет значения на 5 °С ниже предполагаемой температуры плавления, следует урегулировать повышение температуры не более 0,2 °С в мин. Точка сдвига (температура, при которой столбик субстанции заметно двигается по направлению к сгибу в трубке) должна быть от 30 до 34 °С.

Показатель преломления. От 1,454 до 1,459. В соответствии с требованиями ОФС «Рефрактометрия», при температуре 40 °С.

Кислотное число. Не более 2,25. В соответствии с требованиями ОФС «Кислотное число.

Число омыления. От 188 до 198. В соответствии с требованиями ОФС «Число омыления».

Йодное число. От 32 до 38. В соответствии с требованиями ОФС «Йодное число», метод 1.

Перекисное число. Не более 2,0. В соответствии с требованиями ОФС «Перекисное число», метод 1.

Неомыляемые вещества. Не более 0,35 %. В соответствии с требованиями ОФС «Масла жирные растительные».

Посторонние жирные масла. Раствор 1 *г* масла в 3 *мл* эфира должен оставаться при комнатной температуре прозрачным в течение 24 часов.

Летучие вещества. Не более 0,15 %. В соответствии с требованиями ОФС «Масла жирные растительные».

Парафин, воск, смоляные и минеральные масла. В соответствии с требованиями ОФС «Масла жирные растительные».

Альдегиды. В соответствии с требованиями ОФС «Масла жирные растительные».

Вода, белки. В соответствии с требованиями ОФС «Масла жирные растительные».

Мыла. В соответствии с требованиями ОФС «Масла жирные растительные».

Тяжелые металлы. Не более 0,001 %. В соответствии с требованиями ОФС «Тяжелые металлы».

Масса содержимого упаковки. В соответствии с требованиями ОФС «Масса (объем) содержимого упаковки».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание жирных кислот должно быть: пальмитат – от 23 до 30 %, стеарат – от 31 до 37 %, олеат – от 31 до 38 %, линолеат – от 1,6 до 4,8 %, линоленат (при присутствии) – от 0 до 1,5 %, арахидат – от 0 до 1,5 %.

Определение проводят методом ГХ.

Приготовление растворов.

Раствор для проверки пригодности хромаграфической ссистемы. 0,01 г метилстеарата и 0,01 г метилолеата помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят гептаном до метки и перемешивают.

Хроматографические условия

Колонка	Кварцевая капиллярная, 15 м × 0,25 мм, 25% покрытая слоем сорбента фенил - 25% цианопропилметилсиликон толщиной 0,25 мкм (G19 или аналогичная);
Газ-носитель	гелий;
Линейная скорость газа-носителя	48 см/с;
Деление потока	60:1

Температура колонки	Время, мин	Температура, °С
	0	180
	0 – 6	180→240
	6 – 11	240

Температура детектора	250 °С;
Объем пробы	0,1 мкл;
Детектор	пламенно-ионизационный;

Примечание. Определяемые компоненты элюируются в течение температурной программы. Удерживание температуры при 240 °С необходимо только для элюирования высококипящих компонентов.

Пригодность хроматографической системы. Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- коэффициент разделения пиков метилстеарата и метилолеата составляет не менее 1,5;

- относительное время удерживания пика метилстеарата составляет около 0,97, пика олеата 1,0;

- относительное стандартное отклонение. Рассчитанное для площадей пиков метилстеарата и метилолеата, составляет не более 5,0 %.

100-150 г субстанции помещают в круглодонную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 4 мл натрия гидроксида раствора 0,5 М в метаноле, прибавляют несколько «кипелок» (стружек для кипения) и кипятят с обратным холодильником до тех пор, пока шарики жира не перейдут в раствор. Прибавляют 5,0 мл бора фторида раствора 2,0 М в метаноле в кипящую смесь через холодильник и продолжают кипятить в течение 2 мин. Прибавляют от 2 до 5 мл гептана для хроматографии в кипящую смесь через

холодильник и кипятят в течение 1 мин. Прекращают нагревание колбы и отсоединяют ее от обратного холодильника. Прибавляют раствор натрия хлорида насыщенный и перемешивают, затем прибавляют еще насыщенный раствор натрия хлорида до тех пор, пока раствор не поднимется до уровня горловины круглодонной колбы. Около 1 мл органической фазы переносят в пробирку с притертой пробкой, прибавляют небольшое количество натрия сульфата безводного для удаления остатков воды и фильтруют (испытуемый раствор).

Хроматографируют последовательно раствора для проверки хроматографической системы и испытуемый раствор, получая не менее 3 хроматограмм.

На хроматограмме испытуемого раствора, должны обнаруживаться пики метиловых эфиров жирных кислот: пальмитата, стеарата, олеата, линолеата, линолената (при присутствии) и арахидата с относительными временами удерживания 1,0; 1,55; 1,60; 1,72; 1,89 и 2,30 соответственно.

Содержание каждого метилового эфира жирных кислот в субстанции в сумме жирных кислот в препарате в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{Si \cdot 100}{S_0},$$

где *Si* – площадь пика каждого метилового эфира жирных кислот;
S_0 – сумма площадей всех пиков метиловых эфиров алифатических жирных кислот.

Хранение. В воздухонепроницаем контейнере, в защищенном от света месте при температуре от 8 °С до 15 °С.

Клещевины обыкновенной семян масло жирное
Ricini communis semenis oleum pingue

ФС.3.4.0011.18

Взамен ГФ X ст. 479

Жирное масло, получаемое прессованием с последующей очисткой семян культивируемого растения клещевины обыкновенной – *Ricinus communis* L., сем. молочайных - *Euphorbiaceae*.

Описание. Прозрачная, густая и вязкая жидкость от бесцветного до желтого цвета, со слабым характерным запахом. На воздухе в тонком слое медленно густеет, но не образует плотной или твердой пленки.

Подлинность.

Газовая хроматография.

На хроматограмме испытуемого раствора Б, полученного при количественном определении, должны регистрироваться не менее 6 пиков метиловых эфиров жирных кислот с относительными временами удерживания (по тетрадекану) около 3,50; 4,40; 4,44; 4,56; 4,96; 5,12.

Качественная реакция.

Смесь 2 мл субстанции с 1 мл петролейного эфира должна быть прозрачной; при дальнейшем прибавлении петролейного эфира раствор должен помутнеть.

Растворимость. Очень легко растворимо в спирте 96 %, уксусной кислоте ледяной, эфире и хлороформе.

Плотность. От 0,948 до 0,968 г/см^3 (при 20 °С). В соответствии с требованиями ОФС «Плотность».

Температура затвердевания. При охлаждении до – 16 °С застывает в мазеобразную массу от беловатого до желтого цвета. В соответствии с требованиями ОФС «Температура затвердевания».

Показатель преломления. От 1,475 до 1,480. В соответствии с требованиями ОФС «Рефрактометрия».

Кислотное число. Не более 1,5. В соответствии с требованиями ОФС «Кислотное число».

Число омыления. От 176 до 186. В соответствии с требованиями ОФС «Число омыления».

Йодное число. От 82 до 88 В соответствии с требованиями ОФС «Йодное число» (метод 1).

Перекисное число. Не более 10. В соответствии с требованиями ОФС «Перекисное число» (метод 1).

Неомыляемые вещества. Не более 1,0 % (ОФС «Масла жирные растительные»).

Гидроксильное число. Не менее 150. В соответствии с требованиями ОФС «Гидроксильное число».

Посторонние жирные масла. При + 20 °С субстанция должна полностью растворяться в равном объеме спирта 96 %.

Летучие вещества. Не более 0,15 %. В соответствии с требованиями ОФС «Масла жирные растительные».

Тяжелые металлы. Не более 0,001 %. В соответствии с требованиями ОФС «Тяжелые металлы».

Мыла. 50 мл воды помещают в коническую плоскодонную колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 10 капель фенолфталеина раствора 1 % и кипятят на плитке в течение 1 мин, при этом жидкость должна быть бесцветной. Затем к горячей воде прибавляют 5,0 г субстанции, взбалтывают и кипятят в течение 5 мин, после чего колбу с эмульсией охлаждают до комнатной температуры. Колбу ставят на лист белой бумаги и прибавляют еще 10 капель фенолфталеина раствора 1 %. Водный слой должен быть

бесцветным.

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание рицинолевой кислоты в субстанции должно быть не менее 70,0 % в сумме жирных кислот.

Определение проводят методом ГЖХ.

Приготовление растворов.

Раствор тетрадекана. 0,1 г тетрадекана помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят гексаном до метки и перемешивают.

Хроматографические условия

Колонка	капиллярная, 30 м × 0,53 мм, полидиметилсилоксан (или аналогичная);	
Газ-носитель	азот;	
Скорость газа-носителя	4 мл/мин;	
Деление потока	1:7	
Температура колонки	Время, мин	Температура, °С
	0	200
	0 – 10	200
	10 – 15	200→250
Температура испарителя	250 °С;	
Температура детектора	260 °С;	
Объем пробы	1,0 мкл;	
Детектор	пламенно-ионизационный;	
Время анализа	35 мин.	

Пригодность хроматографической системы. Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику тетрадекана, должна быть не менее 20000 теоретических тарелок;

- стандартное отклонение относительных времен удерживания пиков должно быть не более 1 %;

- число пиков на хроматограмме между пиком тетрадекана и метилового эфира рицинолевой кислоты не менее 4;

- коэффициент емкости для метилового эфира рицинолевой кислоты не менее 15;

- разрешение между пиками метилового эфира рицинолевой кислоты и ближайшим пиком составляет не менее 4;

- фактор асимметрии пика должен быть не более 1,5.

Около 1,0 г (точная навеска) субстанции помещают в круглодонную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 10 мл метанола, 0,28 г калия гидроксида. Содержимое колбы нагревают с обратным холодильником на песчаной бане при температуре 105 – 110 °С в течение 1 часа. Смесь охлаждают до комнатной температуры, прибавляют по каплям 0,5 мл диметилсульфата, нагревают с обратным холодильником на песчаной бане при температуре 105 – 110 °С в течение 30 мин и прибавляют 0,2 мл диметилсульфата. Из полученного раствора отгоняют метанол до объема около 2,5 мл. Смесь охлаждают до комнатной температуры, прибавляют 20 мл воды очищенной, переносят в делительную воронку, прибавляют 20 мл гексана и интенсивно встряхивают. Гексановый экстракт отделяют и фильтруют через бумажный фильтр, содержащий 1 г натрия сульфата безводного (испытуемый раствор А).

К 5,0 мл испытуемого раствора А прибавляют 1 мл тетрадекана (испытуемый раствор Б).

Хроматографируют последовательно испытуемый раствор А и испытуемый раствор Б, получая не менее 3 хроматограмм.

На хроматограмме испытуемого раствора Б должны регистрироваться не менее 6 пиков метиловых эфиров жирных кислот с относительными временами удерживания по тетрадекану (внутренний стандарт) около 2,85; 3,52; 3,55; 3,67; 4.27 и 4,65 (метиловый эфир рицинолевой кислоты).

На хроматограмме испытуемого раствор А регистрируют все пики после пика растворителя и принадлежащих метиловым эфирам жирных кислот.

Содержание рицинолевой кислоты в сумме жирных кислот в субстанции в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \cdot 100}{S_0},$$

где S – площадь пика метилового эфира рицинолевой кислоты;
S_0 – сумма площадей всех пиков метиловых эфиров алифатических жирных кислот.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Масла жирные растительные».

Ландыша травы настойка **ФС.3.4.0003.18**

Convallariae herbae tinctura **Взамен ГФ X ст. 687**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Ландыша травы настойку, получаемую из травы дикорастущего растения ландыша майского – *Convallaria majalis* L., ландыша закавказского – *Convallaria transcaucasica Utkin ex Grossh*. и ландыша Кейске – *Convallaria keiskei Mig*., сем. лилейных – *Liliaceae*, применяемую в качестве лекарственного средства.

Для получения настойки используют:

Ландыша травы измельченной - 100 г

Этанола (спирта этилового) 70 % - достаточное количество для получения 1 л настойки

Описание

Прозрачная жидкость зеленовато-коричневого цвета со слабым характерным запахом.

Подлинность

Тонкослойная хроматография

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 8 мкл настойки. Пластинку с нанесенной пробой сушат на воздухе и помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 2 ч смесью растворителей хлороформ – ацетон – метанол (6:2:2) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, пластинку вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, обрабатывают ванилина раствором 1 % в хлорной кислоте разведенной 10 % и нагревают при температуре 80 - 110 °С в течение 10-

30 мин.

На хроматограмме настойки в средней трети должна обнаруживаться зона адсорбции конваллятоксина синевато-красного цвета; допускается обнаружение других зон адсорбции.

Качественная реакция

К 3 мл испытуемого раствора А (см. раздел «Количественное определение. Спектрофотометрический метод» приготовление испытуемого раствора А) прибавляют 2,5 мл натрия пикрата нейтрального раствора и 0,5 мл натрия гидроксида раствора 2 %, через 10 мин должно наблюдаться желтое окрашивание (сердечные гликозиды).

Спирт этиловый. Не менее 64 %. В соответствии с ОФС «Определение спирта этилового в лекарственных средствах».

***Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» (контролируется в течение технологического процесса).

Сухой остаток. Не менее 1,7 %. В соответствии с ОФС «Настойки».

Тяжелые металлы. Не более 0,001 %. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки».

Объем содержимого упаковки. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Определение сердечных гликозидов проводят методом 1 или 2; арбитражным является биологический метод.

1. Биологический метод. 1 мл препарата должен содержать от 10,4 до 13,3 ЛЕД.

В соответствии с требованиями ОФС «Биологические методы оценки активности лекарственного растительного сырья и лекарственных

препаратов, содержащих сердечные гликозиды».

Испытания проводят на травяных лягушках, вводя растворы в лимфатические бедренные мешки (под кожу) или в сердце (в полость желудочка); на водяных лягушках – в сердце (в полость желудочка) или в вену.

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) экстракта ландыша. К 2 мл СО экстракта ландыша прибавляют 8 мл воды (1:4) при введении раствора под кожу. Готовят в день опыта.

К 2 мл СО экстракта ландыша прибавляют 2 мл воды, выпаривают до 2 мл и доводят водой до 8 мл (1:4) при введении раствора в полость сердца или вену. Готовят в день опыта.

К 2 мл настойки ландыша прибавляют 8 мл воды (1:4) (испытуемый раствор - при введении раствора под кожу).

К 2 мл настойки ландыша прибавляют 2 мл воды, выпаривают до 2 мл и доводят водой до 8 мл (1:4) (испытуемый раствор - при введении раствора в полость сердца или вену).

Определив наименьшие дозы раствора СО и испытуемого раствора (в мл на массу травяной лягушки или в мл на 1 г массы водяной лягушки), вычисляют содержание ЛЕД в 1 мл препарата (X) по формуле:

$$X = \frac{B \cdot K}{0{,}3 \cdot A}$$

где A – наименьшая доза в мл, установленная для испытуемого раствора;

B – наименьшая доза в мл, установленная для раствора стандартного образца;

0,3 – доза в мл, соответствующая 1 ЛЕД;

K – число, обозначающее разведение, равное 4.

2. Спектрофотометрический метод. Содержание суммы сердечных гликозидов в пересчете на конваллятоксин в 1 мл препарата должно быть от 0,104 до 0,133 мг.

5,0 мл препарата помещают в выпарительную чашку, упаривают на водяной бане до приблизительно 2 мл. Объем жидкости доводят водой до первоначального объема, прибавляют 1 мл свинца(II) ацетата раствора 10 % и тщательно перемешивают.

Раствор фильтруют через бумажный складчатый фильтр в делительную воронку, фильтр промывают 5 мл воды, прибавляют 30 мл смеси спирт 95 % - хлороформ (2:8) и взбалтывают в течение 5 мин. После расслоения органическую фазу фильтруют через бумажный фильтр с 3 г натрия сульфата безводного, смоченного 5 мл хлороформа, в колбу для отгона. Операцию извлечения спирто-хлороформной смесью повторяют еще дважды, используя по 30 мл спирто-хлороформной смеси того же состава и фильтруют спирто-хлороформное извлечение в ту же колбу для отгона. Фильтр с натрия сульфатом безводным промывают 10 мл спирто-хлороформной смеси. Полученное спирто-хлороформное извлечение отгоняют под вакуумом при 45-50 ^{o}C на роторном испарителе досуха.

Сухой остаток растворяют в 10 мл спирта 25 %, затем колбу выпарительную дважды промывают 5 мл этого же спирта и раствор переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл. Объем раствора в колбе доводят тем же спиртом до метки и перемешивают.

25 мл полученного раствора пропускают через колонку диаметром 1 см, заполненную 1,5 г полиамида для колоночной хроматографии или 5 г силикагеля для хроматографии (L 100/250) (испытуемый раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 15 мл испытуемого раствора А, прибавляют 7,5 мл натрия пикрата раствора нейтрального 1 %, доводят до метки тем же растворителем и тщательно перемешивают (испытуемый раствор Б).

Через 10 мин измеряют оптическую плотность испытуемого раствора Б при длине волны 495 нм, в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют смесь, состоящую из 15 мл спирта 25 %, 7,5 мл натрия пикрата раствора нейтрального 1 %, и 2,5 мл натрия гидроксида раствора 2 %.

Содержание суммы сердечных гликозидов в пересчете на конваллятоксин в 1 мл препарата (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 25 \cdot 1000}{A_{1см}^{1\%} \cdot a \cdot 100} = \frac{A \cdot 50}{A_{1см}^{1\%} \cdot a},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора Б;

a – объем настойки, мл;

$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса конваллятоксина с натрия пикратом при длине волны 495 нм, равный 170;

1000 – коэффициент пересчета г в мг.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки».

Миндаля семян масло жирное **ФС.3.4.0012.18**

Миндальное масло

Amygdali communis oleum pingue **Взамен ГФ X ст. 473**

Жирное масло, получаемое холодным прессованием зрелых семян двух разновидностей миндаля обыкновенного (сладкий и горький) – *Amygdalus communis* L. var. dulcis DC et *Amygdalus communis* L. var. amara DC, сем. розоцветных - *Rosaceae*.

Описание. Прозрачная жидкость светло-желтого цвета без запаха, приятного маслянистого вкуса. На воздухе не высыхает.

Растворимость. Мало растворимо в спирте 96 %, легко растворимо в хлороформе, петролейном эфире.

Подлинность.

Качественная реакция

5 мл масла взбалтывают с 1 мл охлажденной смеси равных объемов воды, серной кислоты концентрированной и азотной кислоты дымящей; образуется масса слабо желтоватого цвета; не должно появляться ни красного окрашивания (масло абрикосовое или персиковое), ни коричневатого (кунжутное или хлопковое масло).

Плотность. От 0,913 до 0,918 г/см^3 (при 20 °С). В соответствии с требованиями ОФС «Плотность».

Температура затвердевания. При температуре – 10 °С не должно застывать, оставаясь жидким и прозрачным, затвердевает при – 18 °С. В соответствии с требованиями ОФС «Температура затвердевания».

Показатель преломления. От 1,470 до 1,472. В соответствии с требованиями ОФС «Рефрактометрия».

Кислотное число. Не более 2,5. В соответствии с требованиями ОФС «Кислотное число». В случае использования в качестве растворителя в лекарственных препаратах для парентерального применения кислотное число не должно превышать 0,56.

Число омыления. От 190 до 195. В соответствии с требованиями ОФС «Число омыления».

Йодное число. От 93 до 102. В соответствии с требованиями ОФС «Йодное число», метод 1.

Перекисное число. Не более 5,0. В соответствии с требованиями ОФС «Перекисное число», метод 1.

Неомыляемые вещества. Не более 0,9 %. В соответствии с требованиями ОФС «Масла жирные растительные».

Посторонние жирные масла (кунжутное, арахисовое, хлопковое). 4 г масла помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл калия гидроксида спиртового раствора 0,5 М, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане при частом взбалтывании до получения однородной прозрачной жидкости. К 20 мл полученной жидкости прибавляют 0,5 мл фенолфталеина раствора 1 % и по каплям кислоту хлористоводородную концентрированную до исчезновения красноватого окрашивания, затем погружают колбу в воду при 15 °С на 10 мин, выделившийся калия хлорид отфильтровывают. 10 мл фильтрата помещают в колбу вместимостью 20 мл и помещают ее в воду при 9-10 °С на 30 мин; не должно наблюдаться образования ни осадка, ни мути.

Летучие вещества. Не более 0,15 %. В соответствии с требованиями ОФС «Масла жирные растительные».

Парафин, воск, смоляные и минеральные масла. В соответствии с требованиями ОФС «Масла жирные растительные».

Альдегиды. В соответствии с требованиями ОФС «Масла жирные растительные».

Вода, белки. В соответствии с требованиями ОФС «Масла жирные растительные».

Мыла. В соответствии с требованиями ОФС «Масла жирные растительные».

Цианиды, синильная кислота. В соответствии с требованиями ОФС «Масла жирные растительные».

Тяжелые металлы. Не более 0,001 %. В соответствии с требованиями ОФС «Тяжелые металлы».

Объем содержимого упаковки. В соответствии с требованиями ОФС «Масса (объем) содержимого упаковки».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Масла жирные растительные».

Мяты перечной листьев настойка **ФС.3.4.0004.18**

Menthae piperitae folii tinctura **Взамен ГФ X ст. 689**

Мяты перечной настойка, получаемая из листьев культивируемого многолетнего растения мяты перечной – *Mentha piperita L.*, сем. яснотковых – *Lamiaceae* и мяты перечной масла, применяемая в качестве лекарственного средства.

Для получения настойки используют:

мяты перечной листьев
(ФС.2.5.0029.15) - 50 г;

мяты перечной масла
с содержанием L-ментола 50 % - 50 г;

спирта этилового 90 % - достаточное количество для получения 1000 мл.

Описание. Прозрачная жидкость от светло-зеленого до темно-зеленого цвета с характерным запахом.

Подлинность.

Приготовление растворов

Раствор стандартного образца (СО) L-ментола. Около 0,05 г (точная навеска) L-ментола растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора 6 месяцев.

5,0 мл настойки переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (испытуемый раствор).

На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля

на алюминиевой или полиэтилентерефталатной подложке размером 15 × 10 см наносят 0,01 мл (10 мкл) испытуемого раствора, рядом наносят 0,01 мл раствора стандартного образца L-ментола. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру со смесью растворителей гексан-этилацетат (9 : 1) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей. Затем пластинку опрыскивают анисового альдегида раствором уксуснокислым в метаноле с последующим выдерживанием при температуре 80 °С в течение 3 - 5 мин и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО L-ментола должна обнаруживаться зона адсорбции фиолетового цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться основная зона адсорбции фиолетового цвета на уровне зоны адсорбции СО L-ментола; допускается обнаружение других зон адсорбции.

Спирт этиловый. Не менее 81 %. В соответствии с требованиями ОФС «Определение спирта этилового в лекарственных средствах».

Метанол и 2-пропанол*. Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» (контролируется на стадии производственного процесса).

Сухой остаток. Не менее 0,4 %. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки».

Тяжелые металлы. Не более 0,001 %. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки».

«**Объем содержимого упаковки**». В соответствии с требованиями ОФС «Настойки» (испытание проводится в случае применения в качестве лекарственного препарата).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота» (категория 3.2 в случае применения в качестве фармацевтической субстанции; категория 3Б в случае применения в ка-

честве лекарственного препарата).

Количественное определение. Проводят одним из ниже приведенных методов.

1. Метод спектрофотометрии в видимой области спектра

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца L-ментола. Около 0,20 г (точная навеска) СО L-ментола, растворяют в 40 мл спирта 96 % в мерной колбе вместимостью 50 мл, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (раствор А). Срок годности раствора А 6 месяцев.

2,5 мл раствора А переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 10 мл спирта 96 %, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (раствор Б).

Срок годности раствора Б 1 месяц.

1,0 мл настойки переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор А испытуемого раствора).

2,5 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 10 мл спирта 96 %, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора).

В две пробирки помещают по 3 мл диметиламинобензальдегида раствора в концентрированной серной кислоте (2). Затем осторожно по стенке пробирки прибавляют в одну – 2 мл L-метола СО раствора (раствор В), в другую – 2 мл раствора Б испытуемого раствора (раствор Г) и тщательно перемешивают.

Оптическую плотность раствора Г измеряют через 20 мин на спектрофотометре при длине волны 545 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора В.

В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 3 мл диметиламинобензальдегида раствора в концентрированной серной кислоте (2) и 2 мл воды.

Содержание суммы терпеноидов в пересчете на L-ментол в настойке в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \times a_o \times 50 \times 50 \times 2{,}5 \times 100 \times P}{A_o \times 1 \times 2{,}5 \times 50 \times 50 \times 100} = \frac{A \cdot a_o \cdot P}{A_o},$$

где:

A - оптическая плотность испытуемого раствора;

A_o - оптическая плотность раствора стандартного образца L-ментола;

1 - объем настойки, взятый для определения, мл;

P – содержание основного вещества в СО L-ментола, %;

a_o – навеска стандартного образца L-ментола, г.

Содержание суммы терпеноидов в пересчете на L-ментол в настойке должно быть не менее 2,0 %.

2. Метод газовой хроматографии

Проверка пригодности хроматографической системы.
Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:
- фактор асимметрии пика L-ментола на хроматограмме раствора СО L-ментола должен находиться в пределах от 0,8 до 1,5;
- эффективность хроматографической колонки должна быть не менее 50000 теоретических тарелок.

Условия хроматографирования:

- колонка капиллярная 60 м × 0,32 мм;
- жидкая фаза – 100 % полиэтиленгликоль (или аналогичная);
- детектор пламенно-ионизационный;
- газ-носитель: азот особой чистоты;
- скорость газа-носителя 20 $см^3$/мин;
- скорость водорода – 40 $см^3$/мин;
- скорость воздуха - 400 $см^3$/мин;
- температура термостата колонки 170 °С;
- температура испарителя 250 °С;
- температура детектора 250 °С;

- объем вводимых растворов – 1 мкл;

- время регистрации хроматограммы 15 мин.

Хроматографируют 1 мкл раствора стандартного образца L-ментола, получая не менее 5 хроматограмм.

Результаты считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Хроматографируют попеременно по 1 мкл испытуемого раствора и раствора СО L-ментола, приготовленных для испытания по разделу «Подлинность» (метод ТСХ), получая не менее 3 хроматограмм.

Расчет содержания L-ментола проводят методом внешнего стандарта.

Содержание L-ментола в настойке в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \times a_o \times 25 \times 100 \times P}{S_o \times 50 \times 5 \times 100} = \frac{S \times a_o \times P}{S_o \times 10},$$

где:

S – площадь основного пика на хроматограмме испытуемого раствора;

S_o – площадь основного пика на хроматограмме раствора стандартного образца L-ментола;

P – содержание основного вещества в СО L-ментола, %;

a_o - навеска стандартного образца L-ментола, г.

Содержание L-ментола в настойке должно быть не менее 2,0 %.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС "Хранение лекарственных средств".

Персика семян масло жирное **ФС.2.5.0013.18**

Персиковое масло

Persicae semini oleum pingue **Взамен ГФ X, ст. 478**

Жирное масло, получаемое холодным прессованием семян следующих растений: персик обыкновенный – *Persica vulgaris* Mill., абрикос обыкновенный – *Armeniaca vulgaris* Lam., слива домашняя – *Prunus domestica* L.,, слива расторпыренная (син. алыча) – *Prunus divaricata* Ledeb., семейства розоцветных – *Rosaceae*, подсемейства сливовых - *Prunoideae*, применяемое для производства лекарственных препаратов.

Описание. Прозрачная жидкость от светло-желтого до желтого цвета без запаха или со слабым характерным запахом. На воздухе не высыхает.

Растворимость. Растворимо в 60 частях этанола (спирт этиловый абсолютированный), легко растворимо в хлороформе.

Подлинность. 5 мл масла взбалтывают с 1 мл охлажденной смеси равных объемов воды, серной кислоты концентрированной и азотной кислоты дымящей, энергично встряхивают и оставляют до разделения слоев; должно наблюдаться красноватое окрашивание.

Плотность. От 0, 914 до 0,920 г/см^3 в соответствии с требованиями ОФС «Плотность».

Температура затвердевания. Не выше минус 18 °С. В соответствии с требованиями ОФС «Температура затвердевания».

Показатель преломления. От 1,470 до 1,473. В соответствии с требованиями ОФС «Рефрактометрия».

Кислотное число. Не более 2,5. В соответствии с требованиями ОФС «Кислотное число». В случае использования в качестве растворителя в ле-

карственных препаратах для парентерального применения кислотное число не должно превышать 0,56.

Число омыления. От 187 до 195. В соответствии с требованиями ОФС «Число омыления».

Йодное число. От 96 до 103. В соответствии с требованиями ОФС «Йодное число».

Перекисное число. Не более 5,0. В соответствии с требованиями ОФС «Перекисное число», метод 1.

Посторонние жирные масла. 4 г масла помещают в колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл 0,5 М раствора калия гидроксида спиртового, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане при частом перемешивании до получения однородной прозрачной жидкости (раствор А).

20 мл раствора А помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 40 мл теплой воды и перемешивают; раствора должен оставаться прозрачным - отсутствие минеральных масел (раствор Б).

Раствор Б переносят в делительную воронку вместимостью 250 мл, прибавляют 10 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 %, перемешивают и добавляют 25 мл эфира. Осторожно взбалтывают в течение 2 мин и оставляют до разделения слоев. Эфирный слой отделяют в коническую колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 2 г натрия сульфата безводного, периодически взбалтывают в течение 5 - 10 мин и фильтруют через вату, смоченную эфиром в круглодонную колбу вместимостью 100 мл. Эфир отгоняют с помощью роторного испарителя при пониженном давлении при температуре (35 ± 5) °С, удаляя остаток продуванием до исчезновения запаха эфира. Жидкий остаток жирных кислот фильтруют через бумажный фильтр в пробирку вместимостью 10 мл. Фильтрат через 24 ч при температуре (20 ± 5) °С должен оставаться прозрачным.

1 мл фильтрата смеси жирных кислот пипеткой переносят в пробирку вместимостью 5 мл, прибавляют 1 мл спирта 96 % и взбалтывают; раствор

должен оставаться прозрачным. Прибавляют повторно еще 1 мл спирта 96 % и взбалтывают; раствор должен оставаться прозрачным (отсутствие посторонних масел).

Парафин, воск, смоляные и минеральные масла. В соответствии с требованиями ОФС «Масла жирные растительные».

Вода, белки. В соответствии с требованиями ОФС «Масла жирные растительные».

Мыла. В соответствии с требованиями ОФС «Масла жирные растительные».

Кунжутное, арахисовое, хлопковое масла. К 20 мл раствора А, полученного при испытании по показателю «Посторонние масла», прибавляют 0,5 мл раствора фенолфталеина и по каплям кислоту хлористоводородную до исчезновения красноватого окрашивания. Колбу погружают на 10 мин в охлажденную до (15 ± 2) °С воду, выделившийся калия хлорид фильтруют через бумажный фильтр, собирая фильтрат в коническую колбу вместимостью 50 мл. Пробирку с 10 мл фильтрата помещают в воду с температурой (9 ± 1) °С на 30 мин; в фильтрате не должно появляться ни осадка, ни помутнения.

Цианиды и синильная кислота. Должны отсутствовать. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Масла жирные растительные».

Тяжелые металлы. Не более 0,001 %. В соответствии с требованиями ОФС «Тяжелые металлы».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Хранение. В плотно закрытой упаковке в защищенном от света месте в соответствии с требованиями ОФС «Масла жирные растительные».

Полыни горькой травы настойка
Artemisiae absinthii herbae tinctura

ФС.3.4.0006.18

Взамен ГФ X ст. 685 и ФС 42-2434-93

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Полыни горькой травы настойку, получаемую из высушенной травы дикорастущего многолетнего травянистого растения полыни горькой – *Artemisia absinthium* L., сем. астровых – *Asteraceae,* применяемую в качестве лекарственного средства.

Для получения настойки используют:

Полыни горькой травы	- 200 г;
этанола (спирта этилового) 70 %	- достаточное количество для получения 1000 мл.

Описание. Прозрачная жидкость коричневато-зеленого цвета, с характерным запахом.

Подлинность

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) рутина. Около 0,001 г СО рутина (рутина тригидрата) растворяют при нагревании на водяной бане в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор стандартного образца (СО) хлорогеновой кислоты. Около 0,001 г СО хлорогеновой кислоты растворяют в 10 мл спирта 96 % и пе-

ремешивают. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят в виде полос длиной 10 мм и шириной 2 мм 20 мкл (0,02 мл) препарата и параллельно в одну полосу по 10 мкл (0,01 мл) растворов СО рутина и хлорогеновой кислоты. Пластинку с нанесенными пробами сушат в течение 5 мин, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 30 мин смесью растворителей этилацетат - муравьиная кислота безводная - вода (40:4:6), и хроматографируют восходящим способом.Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, выдерживают при температуре 100 – 105 °С в течение 2 – 3 мин и еще теплую обрабатывают последовательно дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира раствором 1 % в спирте 96 % и макрогола 400 раствором спиртовым 5 % и просматривают через 30 мин в УФ-свете (365 нм).

На хроматограмме растворов СО рутина и СО хлорогеновой кислоты должны обнаруживаться: зона адсорбции с флуоресценцией желтого, желто-оранжевого или оранжевого цвета (рутин) и зона адсорбции с флуоресценцией голубого цвета (хлорогеновая кислота).

На хроматограмме препарата должны обнаруживаться: зона адсорбции с флуоресценцией желтого, желто-зеленого, желто-оранжевого или оранжевого цвета на уровне зоны адсорбции СО рутина; две зоны адсорбции с флуоресценцией голубого цвета на уровне зоны адсорбции СО хлорогеновой кислоты и выше нее; допускается обнаружение дополнительных зон адсорбции.

Качественные реакции

1. 10 мл препарата помещают в фарфоровую чашку, упаривают в на водяной бане до объема около 1 мл, прибавляют 0,2 мл аммиака раствора 10 %, 0,1 г смеси кальция и талька (1 : 1), перемешивают до получения

порошкообразной массы, которую обрабатывают 10 мл эфира. Эфирные извлечения помещают в фарфоровую чашку, эфир отгоняют досуха. К сухому остатку прибавляют 0,5 мл серной кислоты концентрированной; должно наблюдаться красновато-коричневое окрашивание, переходящее в фиолетовое при прибавлении спирта 96 % (гликозиды).

2. К 10 мл препарата помещают в делительную воронку, прибавляют 10 мл воды, тщательно перемешивают и взбалтывают с эфиром 2 раза порциями по 10 мл в течение 3 мин. После разделения слоев эфирное извлечение сливают. Первое эфирное извлечение отбрасывают, второе эфирное извлечение осторожно упаривают на водяной бане досуха. Сухой остаток растворяют в 2 мл спирта 96 %, осторожно прибавляют 2 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и нагревают на водяной бане; должно наблюдаться зеленое окрашивание, постепенно переходящее в коричневое (сесквитерпеновые лактоны азуленового ряда).

3. К остатку в делительной воронке (после обработки эфиром) прибавляют 5 мл бутанола,предварительно насыщенного водой (7 : 3), и взбалтывают в течение 3 мин. После разделения слоев бутанольное извлечение сливают и упаривают на водяной бане до полного удаления растворителя. Остаток бутанольного извлечения растворяют в 5 мл спирта 96 %, прибавляют 0,2 г магния порошка и постепенно, осторожно приливают 1 мл хлористоводородной кислоты концентрированной; через 20 – 30 мин должно наблюдаться красновато-коричневое окрашивание (флавоноиды).

Спирт этиловый. Не менее 64 %. В соответствии с ОФС «Определение спирта этилового в лекарственных средствах».

***Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» (контролируется в течение технологического процесса).

Сухой остаток. Не менее 3,0 %. В соответствии с ОФС «Настойки».

Тяжелые металлы. Не более 0,001 %. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Объем содержимого упаковки. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в препарате должно быть не менее 0,05 %.

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) рутина. Около 0,05 г (точная навеска) СО рутина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и растворяют при нагревании на водяной бане в 85 мл спирта 96 %, охлаждают, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор А СО рутина). Срок годности раствора не более 1 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

1,0 мл раствора А СО рутина, 5 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 % и 0,1 мл уксусной кислоты ледяной, помещенных в мерную колбу вместимостью 25 мл доведенных спиртом 96 % до метки (раствор Б СО рутина). Срок годности раствора не более 1 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

2,0 мл препарата помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят спиртом 70 % до метки и перемешивают (испытуемый раствор А).

5,0 мл испытуемого раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл алюминия хлорида раствора 2 % в спирте 96 %, 0,1 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора).

Через 30 мин измеряют оптическую плотность испытуемого раствора Б на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной

слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 5 мл испытуемого раствора А, 0,1 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, доведенный спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО рутина в таких же условиях. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1,0 мл раствора А СО рутина, 0,1 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, доведенный спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в препарате в пересчете на рутин в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 25 \cdot 25 \cdot P \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 5 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100 \cdot} = \frac{A \cdot a_0 \cdot 0{,}05 \cdot P}{A_0 \cdot a},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
A_o – оптическая плотность раствора Б СО рутина;
a – объем настойки, мл;
a_o – навеска СО рутина, г;
P – содержание основного вещества в СО рутина, %.

Допускается содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин вычислять с использованием удельного показателя поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 25}{A_{1см}^{1\%} \cdot a},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
a – объем настойки, мл;
$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при длине волны 410 нм, равный 260.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки».

Пустырника травы настойка **ФС.3.4.0007.18**

Leonuri herbae tinctura **Взамен ГФ X ст. 688**

ФС 42-0197-07

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Пустырника травы настойку, получаемую из высушенной травы дикорастущего и культивируемого травянистого растения пустырника пятилопастного – *Leonurus quinquelobatus Gilib*. и пустырника сердечного (пустырника обыкновенного) – *Leonurus cardiaca* L. (*L. cardiaca*, *L. subsp. villosus (Desf.) Jav*.), сем. яснотковых – *Lamiaceae,* применяемую в качестве лекарственного средства.

Для получения настойки используют:

пустырника травы - 200 г;

этанола (спирта этилового) 70 % - достаточное количество для получения 1000 мл.

Описание. Прозрачная жидкость от светло-коричневого или зеленовато-коричневого до темно-коричневого с зеленоватым оттенком цвета, со слабым характерным запахом.

Подлинность

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов

Раствор стандартного образца (СО) метилового красного. Около 0,002 г СО метилового красного растворяют в 10 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 6 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят в виде полос длиной 10 мм и шириной не более 2 мм 20 мкл (0,02 мл) препарата и 5 мкл (0,005 мл) раствора СО метилового красного. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре в течение 10 мин, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 30 мин смесью растворителей толуол – этилацетат – уксусная кислота ледяная (70:25:5) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, обрабатывают диметиламинобензальдегида раствором 2 %, выдерживают при температуре около 100 °С в течение 2 – 3 мин и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО метилового красного должна обнаруживаться зона адсорбции розового или красного цвета.

На хроматограмме препарата должна обнаруживаться не менее двух зон адсорбции розового цвета выше и ниже зоны адсорбции СО метилового красного, быстро переходящие в зоны адсорбции серовато-синего цвета; допускается обнаружение дополнительных зон адсорбции (иридоиды).

Качественные реакции

1. К 1 мл препарата прибавляют 0,2 мл железа (III) хлорида раствора 3 %, должно наблюдаться черно-зеленое окрашивание (дубильные вещества).

2. К 2 мл препарата прибавляют 0,2 г магния порошка, осторожно приливают 0,5 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и нагревают на кипящей водяной бане, постепенно должно наблюдаться красноватое окрашивание (флавоноиды).

Спирт этиловый. Не менее 64 %. В соответствии с требованиями ОФС «Определение спирта этилового в лекарственных средствах».

***Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» (контролируется в течение технологического процесса).

Сухой остаток. Не менее 1,4 %. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки».

Тяжелые металлы. Не более 0,001 %. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки».

Объем содержимого упаковки. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в препарате должно быть не менее 0,02 %.

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) рутина. Около 0,05 г (точная навеска) СО рутина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и растворяют при нагревании на водяной бане в 85 мл спирта 96 %, охлаждают, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор А СО рутина). Срок годности раствора не более 1 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

1,0 мл раствора А СО рутина, 0,1 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, 5 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 %, помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят спиртом 96 % до метки (раствор Б СО рутина). Срок годности раствора не более 1 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

5,0 мл препарата помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят спиртом 70 % до метки и перемешивают (испытуемый раствор А).

5,0 мл испытуемого раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл алюминия хлорида раствора 2 % в спирте 96 %, 0,1 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, доводят объем

раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (испытуемый раствор Б).

Через 30 мин измеряют оптическую плотность испытуемого раствора Б на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 5 мл испытуемого раствора А, 0,1 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, доведенный спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно тех же условиях измеряют оптическую плотность раствора Б СО рутина. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1,0 мл раствора А СО рутина, 0,1 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, доведенный спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в препарате в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 25 \cdot 25 \cdot P \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 5 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100} = \frac{A \cdot a_0 \cdot 0{,}05 \cdot P}{A_0 \cdot a}$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора Б;
A_o – оптическая плотность раствора Б СО рутина;
a – объем настойки, мл;
a_o – навеска СО рутина, г;
P – содержание основного вещества в СО рутина, %.

Допускается содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин вычислять с использованием удельного показателя поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 25}{A_{1см}^{1\%} \cdot a},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора Б;
a – объем настойки, мл;
$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса рутина с

алюминия хлоридом при длине волны 410 нм, равный 260.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки».

Родиолы розовой корневищ и корней экстракт жидкий **ФС.3.4.0008.18**

Rhodiolae roseae rhizomatum et radicum extractum liquidum **Взамен ФС 42-2163-96**

Родиолы экстракт жидкий, получаемый из корневищ и корней многолетнего дикорастущего или культивируемого травянистого растения *родиолы розовой – Rhodiola rosea* L.*, сем. толстянковых – Crassulaceae*, применяемый в качестве лекарственного препарата.

Для получения препарата необходимо:

родиолы розовой корневищ и корней - 1000 г;

этанола (спирта этилового) 40 % - достаточное количество для получения 1000 мл.

Описание. Жидкость от светло-коричневого до темно-коричневого цвета с красноватым оттенком с характерным запахом. В процессе хранения возможно образование осадка.

Подлинность.

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) розавина. 4,0 мг СО розавина растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в хорошо укупоренной упаковке в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор для детектирования. Смешивают последовательно: 0,5 мл анисового альдегида, 10 мл уксусной кислоты ледяной, 85 мл спирта 96 % и 5 мл серной кислоты концентрированной. Срок годности раствора не более 1 мес при хранении в хорошо укупоренной упаковке в прохладном, защищенном от света месте.

Тонкослойна хроматография

К 1 мл препарата прибавляют 9 мл спирта 40 % и перемешивают (испытуемый раствор).

На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором наносят в виде полосы длиной 10 мм и шириной не более 2 мм по 40 мкл (0,04 мл) испытуемого раствора и раствора СО розавина. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре в течение 15 мин, помещают в хроматографическую камеру, предварительно насыщенную в течение 3 ч смесью растворителей хлороформ – метанол – вода (26 : 14: 3), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 - 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и просматривают в УФ – свете (254 нм).

На хроматограмме раствора СО розавина должна обнаруживаться зона адсорбции фиолетового цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции фиолетового цвета на уровне зоны адсорбции СО розавина; допускается обнаружение дополнительных зон адсорбции.

Хроматограмму опрыскивают раствором для детектирования, выдерживают при температуре 100 - 105 °С в течение 2 - 3 мин и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО розавина должна обнаруживаться зона адсорбции коричневато-зеленого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции коричневато-зеленого на уровне зоны адсорбции СО розавина; допускается обнаружение дополнительных зон адсорбции.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

Времена удерживания основных пиков на хроматограмме испытуемого раствора, приготовленного для количественного определения, должны соот-

ветствовать временам удерживания основных пиков на хроматограммах раствора СО розавина и раствора СО салидрозида.

Спирт этиловый. Не менее 34,0 %. В соответствии с требованиями ОФС «Определение спирта этилового в лекарственных средствах».

***Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» (контролируется в течение технологического процесса).

Тяжелые металлы. Не более 0,01 %. В соответствии с требованиями ОФС «Экстракты».

Сухой остаток. Не менее 5,0 %. В соответствии с требованиями ОФС «Экстракты».

Объем содержимого упаковки. В соответствии с требованиями ОФС «Экстракты».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Гликозиды коричного спирта. Салидрозид. Содержание суммы гликозидов коричного спирта в пересчете на розавин - не менее 0,1 %, салидрозида - от 0,5 % до 0,8 %.

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) розавина. Около 0,010 г (точная навеска) СО розавина растворяют в метаноле в мерной колбе вместимостью 25 мл, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают (раствор А СО розавина).

10,0 мл раствора А СО розавина переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают (раствор Б СО розавина*).* Срок годности не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор стандартного образца (СО) салидрозида. Около 0,010 г (точная навеска) СО салидрозида растворяют в метаноле в мерной колбе вместимостью 25 мл, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают (раствор А СО салидрозида).

10,0 мл раствора А СО салидрозида переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают (раствор Б СО салидрозида*).* Срок годности не более 3 мес при хране-

нии в прохладном, защищенном от света месте.

Испытуемый раствор: предварительно профильтрованный через мембранный нейлоновый фильтр (размер пор 0,2 мкм) препарат.

Приготовление фосфатного буфера (pH 7,0).

1. 8,0 г натрия гидроксида растворяют в около 500 мл воды в мерной колбе вместимостью 1000 мл, полученный раствор доводят водой до метки и перемешивают (раствор натрия гидроксида 0,2 М*).*

Срок годности раствора 6 мес при хранении в хорошо укупоренной упаковке, в прохладном защищенном от света месте.

2. 6,8 г калия фосфата однозамещенного растворяют в 500 мл воды в мерной колбе вместимостью 2000 мл, затем добавляют 130 мл раствора натрия гидроксида 0,2 М, добавляют еще 800 мл воды и перемешивают. Значение pH определяют потенциометрически. При необходимости добавляют раствор натрия гидроксида 0,2 М и доводят объем раствора водой до метки.

Приготовленный раствор фильтруют под вакуумом через нейлоновый мембранный фильтр с размером пор не более 0,45 мкм.

Срок годности раствора 1 сутки.

Проверка пригодности хроматографической системы.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пикам СО салидрозида и СО розавина должна быть не менее 2000 и не менее 5000 теоретических тарелок соответственно;

- фактор асимметрии (Т) для пиков салидрозида и розавина должен быть не менее 0,8 и не более 1,5.

Хроматографические условия

Колонка	250 × 4,0 мм, эндкеппированный октадецилсилил (C_{18}) силикагель для хроматографии, 5 мкм
Предколонка	20 × 4 мм, эндкеппированный октадецилсилил (C_{18}) силикагель для хроматографии, 5 мкм
Подвижная фаза	А - фосфатный буфер (pH 7,0); В - ацетонитрил
Способ элюирования	градиент

Время	**А, об. %**	**В, об. %**
0	89	11
10	89	11
30	70	30

35	20	80
45	20	80
50	89	11
70	89	11

Скорость подвижной фазы, мл/мин	1,0
Температура колонки, °С	50 ± 1
Детектор	диодная матрица или спектрофотометрический 250 нм (для определение суммы гликозидов коричного спирта в пересчете на розавин); 219 нм (определение салидрозида)
Объем вводимой пробы, мкл	10
Время хроматографирования, мин	70

На хроматограмме испытуемого раствора (длина волны УФ-детектора 250 нм) в области пика, соответствующего по времени удерживания СО розавина, выходят не менее 3 пиков других гликозидов коричного спирта, из которых 1 слева и 2 справа от пика розавина.

Хроматографируют последовательно не менее 5 раз растворы СО салидрозида (раствор Б СО салидрозида) и СО розавина (раствор Б СО розавина) и вычисляют среднее значение площади пика для каждого СО.

Испытуемый раствор хроматографируют не менее 3 раз.

Содержание гликозидов коричного спирта в пересчете на розавин в препарате в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_o \cdot 10 \cdot P \cdot 100}{S_o \cdot 25 \cdot 25 \cdot V} = \frac{S \cdot a_o \cdot 1{,}6 \cdot P}{S_o \cdot V}$$

где:

S – площадь пиков гликозидов коричного спирта на хроматограмме испытуемого раствора;

S_o – площадь основного пика на хроматограмме раствора Б СО розавина;

a_o – навеска СО розавина, г;

P – содержание основного вещества в СО розавина, %;

10, 25 – разведения, мл;

V – объем препарата, мл.

Содержание салидрозида в препарате в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_o \cdot 10 \cdot P \cdot 100}{S_o \cdot 50 \cdot 25 \cdot V} = \frac{S \cdot a_o \cdot 0{,}8 \cdot P}{S_o \cdot V}$$

где:

S – площадь пика салидрозида на хроматограмме испытуемого раствора;

S_o – площадь пика на хроматограмме раствора Б СО салидрозида;

a_o – навеска СО салидрозида, г;

P – содержание основного вещества в СО салидрозида, %;

10, 25, 50 – разведения, мл;

V – объем препарата, мл.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Экстракты».

Терпентинное масло эфирное очищенное **ФС.3.4.0014.18**

Скипидар очищенный

Terebinthinae oleum

aetheroleum rectificatum **Взамен ГФ X ст. 480**

Эфирное масло, получаемое перегонкой живицы из сосны обыкновенной - *Pinus silvestris* L., сем. сосновых – *Pinaceae*, и применяемого в качестве лекарственного средства.

Главные составные части: α-пинен, Δ^3-карен, дипентен, терпинеол и др.

Описание. Прозрачная, бесцветная или слегка желтоватая, подвижная жидкость с характерным запахом и жгучим вкусом.

Растворимость. Масло практически нерастворимо в воде, растворимо в спирте; смешивается во всех соотношениях с эфиром, хлороформом, петролейным эфиром и жирными маслами.

Подлинность.

Приготовление растворов

Фосфорномолибденовой кислоты спиртовый раствор 5 %. 1,25 г фосфорномолибденовой кислоты растворяют в 25 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора 2 сут.

Газовая хроматография.

На хроматограмме испытуемого раствора, полученного при количественном определении, время удерживания основного пика должно совпадать с временем удерживания основного пика на хроматограмме СО α-пинена.

Качественная реакция.

1. К 0,1 мл субстанции прибавляют 0,9 мл спирта 96 %, 0,5 мл фосфорномолибденовой кислоты спиртового раствора 5 %, 0,5 мл серной

кислоты концентрированной и осторожно перемешивают; должно наблюдаться ярко-зеленое окрашивание (терпеноиды).

2. К 3 мл субстанции очень осторожно, по стенке, не взбалтывая, прибавляют 1 мл раствора п-диметиламинобензальдегида в серной кислоте концентрированной; на границе раздела слоев должно наблюдаться кольцо коричневато-красного цвета (терпеноиды).

Плотность. От 0,855 до 0,863 г/см^3 (при 20 °С). В соответствии с требованиями ОФС «Плотность».

Показатель преломления. От 1,467 до 1,472. В соответствии с требованиями ОФС «Рефрактометрия».

Температурный предел перегонки. От 153 до 170 °С. В соответствии с требованиями ОФС «Температурные пределы перегонки и точка кипения».

Кислотное число. Не более 0,7. В соответствии с требованиями ОФС «Кислотное число».

Жирные и минеральные масла. 0,05 мл испытуемого масла помещают на фильтровальную бумагу. Пятно масла должно испариться с бумаги полностью в течение 24 ч без оставления следа.

Перекиси. *2* мл субстанции смешивают с раствором 0,02 г бензидина в *2* мл 95 % спирта; жидкость может быть окрашена в желтый цвет, но не в красный (перекиси).

Альдегиды. В сухую пробирку помещают 0,1 г натрия гидроксида, прибавляют *3* мл свежеперегнанного масла и оставляют на 4 час. Жидкость над натрия гидроксидом не должна окрашиваться в коричневый или желтовато-коричневый цвет.

Остаток эфирного масла после выпаривания. Содержание остатка эфирного масла после выпаривания не должно превышать 0,5 %.

В предварительно взвешенную выпарительную чашку диаметром 7 – 9 см, находящуюся на песчаной бане, нагретой до 155 °С, медленно, по каплям вливают 5 мл масла, добавляя последующие капли после испарения предыду-

щих. После испарения масла чашку помещают на 15 мин в сушильный шкаф, нагретый до 150 °С, охлаждают в эксикаторе и взвешивают.

Содержание остатка эфирного масла после выпаривания (*X*) в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(m_1 - m_0) \cdot 100}{5 \cdot \rho} = \frac{(m_1 - m_0) \cdot 20}{\rho},$$

где m_1 – масса чашки с остатком после выпаривания, г;
m_0 – масса пустой чашки, г;
5 – объем испытуемого масла, мл;
ρ – плотность масла, г/см^3.

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание α-пинена в субстанции должно быть не менее 60,0 %.

Определение проводят методом ГЖХ.

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) α-пинена. Около 0,05 г α-пинена помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 20 мл спирта 96 %, доводят объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивают.

Хроматографические условия

Колонка	капиллярная, 60 м × 0,32 мм, 5 %-фенил-95 %-диметилсилоксан, 0,25 мкм;
Газ-носитель	гелий;
Скорость газа-носителя	45 см/сек;
Деление потока	1:50

Температура колонки	Время, мин	Температура, °С
	0	90
	0 – 8	90 → 190
	8 – 18	190

Температура испарителя	200 °С;
Температура детектора	250 °С;

Объем пробы 1,0 мкл;

Детектор пламенно-ионизационный;

Пригодность хроматографической системы. Хроматографируют раствор СО α-пинена, получая не менее 5 хроматограмм. Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической системы, рассчитанная по пику α-пинена на хроматограмме раствора СО, должна быть не менее 50000 теоретических тарелок;

- разрешение между пиками спирта 96 % и α-пинена на хроматограмме раствора СО должна быть не менее 10;

- относительное стандартное отклонение площади пика, рассчитанное по пику α-пинена на хроматограмме раствора СО, должно быть не более 4 %.

Около 0,05 г (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 20 мл спирта 96 %, доводят объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивают (испытуемый раствор).

Хроматографируют последовательно раствор СО α-пинена и испытуемый раствор, получая не менее 3 хроматограмм.

Содержание α-пинена в субстанции (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot a \cdot 100},$$

где S – среднее значение площади пика α-пинена на хроматограмме испытуемого раствора;
S_0 – среднее значение площади пика α-пинена на хроматограмме раствора СО α-пинена;
a – навеска испытуемой субстанции, г;
a_0 – навеска СО α-пинена, г;
P – содержание основного вещества в СО α-пинена, %.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Эфирные масла».

Элеутерококка колючего корневищ и корней экстракт жидкий **ФС.3.4.0009.18**

Eleutherococci senticosi rhizomatum et radicum extractum liquidum **Взамен ФС 42-2833-92**

Элеутерококка корневищ и корней экстракт жидкий, получаемый из корневищ и корней дикорастущего кустарника элеутерококка колючего – *Eleutherococcus senticosus* (*Rupr. et Maxim.*) *Maxim.*, сем. аралиевых – *Araliaceae,* применяемый в качестве лекарственного препарата.

Для получения препарата необходимо:

Элеутерококка колючего корневищ и корней - 1000 г;

Этанола (спирта этилового) 40 % - достаточное количество для получения 1000 мл.

Описание. Жидкость от светло-коричневого до темно-коричневого цвета в тонком слое прозрачная, с характерным запахом. В процессе хранения возможно образование легкой опалесценции и осадка.

Подлинность. Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора, полученного при количественном определении (см. раздел «Количественное определение. Элеутерозид В»), должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме раствора СО элеутерозида В.

Ультрафиолетовый спектр раствора Б, полученного при количествен-

ном определении (см. раздел «Количественное определение. Сумма элеутерозидов в пересчете на элеутерозид В»), в области от 250 нм до 350 нм должен иметь максимум поглощения при длине волны (278 ± 3) нм.

10 мл препарата выпаривают в фарфоровой чашке на водяной бане до консистенции сиропа. Остаток растворяют в 5 мл спирта 96 % и фильтруют. К 2 каплям фильтрата прибавляют 2 капли железа(III) хлорида раствора 3 %; должно наблюдаться окрашивание зеленого цвета (полифенольные соединения).

Спирт этиловый. Не менее 33,0 %. В соответствии с требованиями ОФС «Определение спирта этилового в лекарственных средствах».

***Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» (контролируется в течение технологического процесса).

Тяжелые металлы. Не более 0,01 %. В соответствии с требованиями ОФС «Экстракты».

Сухой остаток. Не менее 1 %. В соответствии с требованиями ОФС «Экстракты».

Объем содержимого упаковки. В соответствии с требованиями ОФС «Экстракты».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Элеутерозид В. Содержание элеутерозида В в препарате должно быть не менее 0,015 %.

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) элеутерозида В. Около 0,005 г (точная навеска) СО элеутерозида В помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 20 мл этанола 30 %, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор А).

Срок годности раствора А 1 мес при хранении в плотно укупоренной таре в прохладном, защищенном от света месте.

4 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 30 % до метки и перемешивают (раствор Б).

Раствор Б используют свежеприготовленным.

Проверка пригодности хроматографической системы.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- фактор асимметрии пика элеутерозида В должен находиться в пределах от 0,8 до 1,5;
- эффективность хроматографической колонки должна быть не менее 5000 теоретических тарелок.

5,0 мл препарата помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 40 % до метки и перемешивают. Раствор фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор не более 0,45 мкм (испытуемый раствор).

Условия хроматографирования

Колонка	нержавеющая сталь, 150 × 4,6 мм, октадецилсилилсиликагель (C_{18}) для хроматографии (5 мкм)
Подвижная фаза	ацетонитрил : уксусной кислоты раствор 0,5 % (1 : 9)
Способ элюирования:	изократический
Температура колонки, °С	комнатная
Скорость потока, мл/мин	1
Детектор	УФ-спектрофотометрический или диодная матрица
Длина волны, нм	266
Объем вводимой пробы, мкл	20
Время хроматографирования, мин	15

Хроматографируют попеременно раствор СО элеутерозида В (не менее 5 повторностей) и испытуемый раствор (не менее 3 повторностей). Результаты считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы». Расчет содержания элеутерозида В проводят методом внешнего стандарта.

Содержание элеутерозида В в препарате в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \cdot 25 \cdot a_0 \cdot 4 \cdot \mathrm{P}}{S_0 \cdot 5 \cdot 25 \cdot 25} = \frac{S \cdot 0{,}032 \cdot \mathrm{a_0} \cdot \mathrm{P}}{S_0}$$

где

S – площадь пика элеутерозида В на хроматограмме испытуемого раствора;
S_o – площадь пика элеутерозида В на хроматограмме раствора СО элеутерозида В;
a – объем препарата, мл;
a_o – навеска СО элеутерозида В, г;
P – содержание основного вещества в СО элеутерозида В, %.

Сумма элеутерозидов в пересчете на элеутерозид В. Содержание суммы элеутерозидов в пересчете на элеутерозид В в препарате должно быть не менее 0,12 %.

5,0 мл препарата помещают в делительную воронку вместимостью 100 мл, прибавляют 5 мл воды и 20 мл смеси хлороформ – спирт 96 % (5 : 1). Извлечение проводят в течение 5 мин, после разделения слоев нижний слой фильтруют через бумажный фильтр, содержащий 2 г натрия сульфата безводного. Извлечение элеутерозидов повторяют еще 4 раза последовательно используя 15, 15, 10 и 10 мл смеси хлороформ – спирт 96 % (5 : 1). Каждое извлечение фильтруют через бумажный фильтр, содержащий натрия сульфат безводный, присоединяя к предыдущим извлечениям.

Объединенное извлечение пропускают по 5 мл со скоростью 2 мл/мин

через хроматографическую стеклянную колонку длиной около 25 см и диаметром 10 – 12 мм. В нижнюю часть колонки помещают небольшой ватный тампон, далее загружают 1 г сорбента (высота слоя около 2 см) алюминия оксид нейтральный II степени активности (L 40/250 мкм). Сверху на слой сорбента также помещают небольшой ватный тампон.

Элюат с колонки собирают в мерную колбу вместимостью 100 мл и колонку промывают дополнительным количеством смеси хлороформ – спирт 96 % (5 : 1) до доведения объема раствора в колбе до метки (раствора А).

10,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора смесью хлороформ – спирт 96 % (5 : 1) до метки и перемешивают (испытуемый раствор Б).

Оптическую плотность испытуемого раствора Б измеряют на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 278 нм относительно раствора сравнения. В качестве раствора сравнения используют смесь хлороформ – спирт 96 % (5 : 1).

Содержание суммы элеутерозидов в пересчете на элеутерозид В в препарате в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 50 \cdot 1{,}42}{A_{1\,см}^{1\%} \cdot 5 \cdot 10} = \frac{A \cdot 142}{A_{1см}^{1\%}}$$

где

А – оптическая плотность испытуемого раствора Б;

$A_{1см}^{1\%}$ - удельный показатель поглощения элеутерозида В при 278 нм, равный 302;

1,42 – коэффициент пересчета на сумму элеутерозидов;

10, 50, 100 – разведения, мл;

5 – объем препарата, мл.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Экстракты».

Печени рыб масло жирное	**ФС.3.7.0001.18**
Jecoris pisces oleum pingue	**Взамен ГФ X, ст. 476**

Жирное масло, получаемое из печени рыб: трески атлантической - *Gadus morrhua* Linne, трески балтийской - *Gadus morrhua callarias* Linne, пикши - *Melanogrammus aeglefinus* L., путассу северной - *Micromesistius poutaussou* (Risso) семейства тресковых - *Gadidae* или из печени макроруса тупорылого - *Coryphaenoides rupestris* G. семейства макрорусовые - *Macrouride*, содержащее ретинол, колекальциферол и омега-3 жирные кислоты (эйкозопентаеновой кислоты - не менее 13 %; докозагексаеновой кислоты – не менее 9 %; сумма полиненасыщенных жирных кислот – не менее 28 %), и применяемое в качестве лекарственного средства. Подходящий антиоксидант может быть добавлен.

*В случае наличия в составе рыбьего жира антиоксидантов должна быть осуществлена их идентификация и количественное определение с использованием валидированных методик.

Описание. Прозрачная маслянистая жидкость от светло-желтого до желтого цвета со слабым характерным запахом.

Растворимость. Практически нерастворимо в воде, мало растворимо в спирте 96 %, очень легко растворимо в хлороформе.

Подлинность.

УФ-спектрофотометрия. УФ-спектр испытуемого раствора, полученного для количественного определения ретинола (раздел «Количественное определение. Ретинол»), в интервале длин волн от 240 нм до 360 нм должен иметь максимум поглощения при (325 ± 2) нм.

Высокоэффективная жидкостная хроматография.

На хроматограмме испытуемого раствора, полученного для количе-

ственного определения колекальциферола (раздел «Количественное определение**.** Колекальциферол»), должен регистрироваться основной пик с временем удерживания, соответствующим времени удерживания пика на хроматограмме раствора сравнения.

Газовая хроматография.

На хроматограмме испытуемого раствора, полученного при испытании по разделу «Состав жирных кислот», должны регистрироваться основные пики с временами удерживания, соответствующие временам удерживания основных пиков на хроматограмме раствора стандартных образцов (эйкозопентаеновая кислота и докозагексаеновая кислота).

Плотность. От 0,917 до 0,927 г/см^3 в соответствии с требованиями ОФС «Плотность».

Показатель преломления. От 1,477 до 1,484 в соответствии с требованиями ОФС «Рефрактометрия».

Цветность. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение окраски жидкостей», метод 1.

Субстанция должна выдерживать сравнение со стандартным раствором, приготовленным следующим образом: к 3,0 мл красного исходного раствора прибавляют 25,0 мл желтого исходного раствора, доводят хлористоводородной кислоты раствором 1 % до 50,0 мл и перемешивают.

Перекисное число. Не более 10,0 в соответствии с ОФС «Перекисное число», метод 1.

Число омыления. От 180 до 196 в соответствии с требованиями ОФС «Число омыления».

Йодное число. От 140 до 175 в соответствии с требованиями ОФС «Йодное число».

Кислотное число. Не более 2,0 в соответствии с требованиями ОФС «Кислотное число».

Анизидиновое число. Не более 30,0 в соответствии с требованиями ОФС «Анизидиновое число».

Неомыляемые вещества. Не более 2,0 %.

Испытание проводят весовым методом.

Около 3 г (точная навеска) субстанции помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл свежеприготовленного раствора калия гидроксида спиртового и кипятят на водяной бане с обратным холодильником в течение 1 ч, периодически перемешивая круговыми движениями. Охлаждают до температуры ниже 25 °С и количественно переносят содержимое колбы в делительную воронку вместимостью 500 мл с помощью 100 мл воды. Полученный раствор осторожно встряхивают с эфиром, свободным от пероксидов, трижды по 100 мл. Все эфирные извлечения собирают в отдельную делительную воронку, в которую предварительно помещают 40 мл воды, осторожно встряхивают в течение нескольких минут, оставляют до полного расслоения смеси, затем отбрасывают водный слой. Эфирный слой промывают двумя порциями воды, по 40 мл каждая. Затем промывают поочередно 40 мл калия гидроксида раствором спиртовым 3 % и 40 мл воды, повторяя данную процедуру три раза. Затем эфирный слой несколько раз промывают 40 мл воды до отсутствия щелочной реакции в водном слое по фенолфталеину. Эфирный слой количественно переносят в доведенную до постоянной массы колбу (m_2) с помощью эфира, свободного от пероксидов.

Эфир отгоняют с соответствующими предосторожностями и к остатку прибавляют 6 мл ацетона. Затем аккуратно удаляют растворитель в потоке воздуха. Остаток в колбе сушат до постоянной массы при температуре от 100 до 105 °С, охлаждают в эксикаторе и взвешивают (m_1).

Содержание неомыляемых веществ в процентах (X, %) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(m_1 - m_2) \cdot 100}{a}$$

где m_1 – масса колбы с сухим остатком, г;

m_2 – масса пустой колбы, г;

а – навеска субстанции, г.

Остаток растворяют в 20 мл спирта 96 %, предварительно нейтрализованного по фенолфталеину, и титруют 0,1 М раствором натрия гидроксида спиртовым. Если объем 0,1 М раствора натрия гидроксида спиртового, пошедшего на титрование, более 0,2 мл, расслоение слоев прошло не полностью; при этом взвешенный остаток не может рассматриваться как «Неомыляемые вещества». Испытание следует повторить.

Стеарин. 10 мл субстанции нагревают до 60 – 90 °С, затем охлаждают с помощью ледяной бани до 0 °С и выдерживают в течение 3 ч при этой температуре. Субстанция должна быть прозрачной.

При необходимости, отделяют нерастворимые вещества фильтрованием образца после нагревания.

Тяжелые металлы (медь, свинец, цинк) и мышьяк. Содержание меди – не более 0,0001 %; свинца - не более 0,00005 %; цинка – не более 0,0004 %; мышьяка – не более 0,00005 %.

Испытание проводят атомно-абсорбционным методом; *расчет содержания кадмия, мышьяка, свинца осуществляют методом калибровочной кривой* в соответствии с требованиями ОФС «Атомно-эмиссионная спектрометрия», используя метод микроволновой (при наличии соответствующего лабораторного оборудования) или сухой минерализации.

Приготовление растворов.

Магния нитрата раствор (2). 17,3 г магния нитрата растворяют в мерной колбе вместимостью 100 мл в 70 мл воды, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Аммония дигидрофосфата раствор. 10,0 г аммония дигидрофосфата растворяют в 80 мл воды в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Азотной кислоты раствор 1 %. 8,0 мл азотной кислоты разведенной 12,5 % помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем рас-

твора водой до метки и перемешивают.

Микроволновая минерализация. Около 0,5 г (точная навеска) субстанции помещают в воздухонепроницаемый реакционный сосуд, прибавляют 6 мл кислоты азотной, свободной от тяжелых металлов, 4 мл кислоты хлористоводородной, свободной от тяжелых металлов, и перемешивают. Реакционный сосуд помещают в микроволновое лабораторное оборудование с селективной мощностью от 0 до 630 Вт и программируют нагревание следующим образом:

- от 0 до 15 мин – 80 % мощности;
- от 15 до 20 мин – 100 % мощности;
- от 20 до 40 мин – 80 % мощности.

По окончании программы сосуд охлаждают на воздухе, прибавляют 4 мл кислоты серной, свободной от тяжелых металлов, и повторяют программу нагрева. После охлаждения на воздухе полученный прозрачный и бесцветных раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл с помощью воды дважды по 15 мл. Затем в мерную колбу прибавляют 1,0 мл раствора магния нитрата, 1,0 мл раствора аммония дигидрофосфата, перемешивают, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Одновременно проводят контрольный опыт с добавлением тех же реактивов и выполняют минерализацию в аналогичных с испытуемой субстанцией условиях.

Сухая минерализация. Около 3 г (точная навеска) субстанции помещают в фарфоровый тигель, осторожно обугливают на плитке до прекращения выделения дыма, затем озоляют в муфельной печи при температуре 550 °С. Остаток в тигле растворяют при нагревании в водном растворе азотной кислоты (1 : 1) из расчета 1-5 мл на навеску (в зависимости от зольности субстанции).

Раствор выпаривают до удаления свободной влаги, полученный осадок растворяют в 15 мл азотной кислоты раствора 1 %, количественно переносят

в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем содержимого колбы тем же растворителем до метки и перемешивают.

Одновременно проводят контрольный опыт с добавлением тех же реактивов и выполняют минерализацию в аналогичных с испытуемой субстанцией условиях.

Рабочие стандартные растворы токсичных элементов для построения калибровочного графика готовят из исходных стандартных растворов с аттестованной концентрацией элементов (ГСО меди, мышьяка, свинца, цинка) последовательным разбавлением их 1 % раствором азотной кислоты до требуемых значений рабочего диапазона измерений. Содержание элементов в растворе не должно выходить за пределы содержания рабочего диапазона измерений. В случае превышения пределов рабочего диапазона измерений разбавление проб производится 1 % раствором азотной кислоты. В качестве нулевого стандарта применяется 1 % раствор азотной кислоты.

Приготовление растворов.

Приготовление основных стандартных растворов.

1. *Стандартные растворы меди* готовят разбавлением стандартного раствора меди с концентрацией ионов меди 1 мг/мл (ГСО 7764-2000 или аналогичный).

Стандартный раствор А меди с концентрацией 1000 мкг/л. 1 мл раствора ГСО меди с концентрацией ионов меди 1 мг/мл помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, доводят объем азотной кислоты раствором 1 % до метки и перемешивают.

Стандартный раствор Б меди с концентрацией 10 мкг/л. 1 мл раствора стандартного раствора А меди с концентрацией ионов меди 1000 мкг/л помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем азотной кислоты раствором 1 % до метки и перемешивают.

Стандартный раствор В меди с концентрацией 20 мкг/л. 2 мл раствора стандартного раствора А меди с концентрацией ионов меди 1000 мкг/л помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем азотной

кислоты раствором 1 % до метки и перемешивают.

Стандартный раствор Г меди с концентрацией 30 мкг/л. 3 мл раствора стандартного раствора А меди с концентрацией ионов меди 1000 мкг/л помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем азотной кислоты раствором 1 % до метки и перемешивают.

2. *Стандартные растворы свинца* готовят разбавлением ГСО свинца с концентрацией 1 мг/мл (ГСО 7877-2000 или аналогичный).

Стандартный раствор А свинца с концентрацией 1000 мкг/л. 1 мл ГСО свинца с концентрацией ионов свинца 1 мг/мл помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, доводят объем азотной кислоты раствором 1 % до метки и перемешивают.

Стандартный раствор Б свинца с концентрацией 10 мкг/л. 1 мл стандартного раствора А свинца с концентрацией ионов свинца 1000 мкг/л помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем азотной кислоты раствором 1 % до метки и перемешивают.

Стандартный раствор В свинца с концентрацией 20 мкг/л. 2 мл стандартного раствора А свинца с концентрацией ионов свинца 1000 мкг/л помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем азотной кислоты раствором 1 % до метки и перемешивают.

Стандартный раствор Г свинца с концентрацией 30 мкг/л. 3 мл стандартного раствора А свинца с концентрацией ионов свинца 1000 мкг/л помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем азотной кислоты раствором 1 % до метки и перемешивают.

3. *Стандартные растворы цинка* готовят разбавлением стандартного раствора цинка с известной концентрацией ионов цинка 1 мг/мл (ГСО 7770-2000 или аналогичный).

Стандартный раствор А цинка с концентрацией 1 мг/л. 0,5 мл ГСО цинка с концентрацией ионов цинка 1 мг/мл помещают в мерную колбу вме-

стимостью 500 мл, доводят объем раствором азотной кислоты 1 % до метки и перемешивают.

Стандартный раствор Б цинка с концентрацией 2 мг/л. 1 мл ГСО цинка с концентрацией ионов цинка 1 мг/мл помещают в мерную колбу вместимостью 500 мл, доводят объем раствором азотной кислоты 1 % до метки и перемешивают.

Стандартный раствор В цинка с концентрацией 3 мг/л. 1,5 мл ГСО цинка с концентрацией ионов цинка 1 мг/мл помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствором азотной кислоты 1 % до метки и перемешивают.

4. *Стандартные растворы мышьяка* готовят разбавлением ГСО мышьяка с концентрацией мышьяка 0,1 мг/мл (ГСО 7344-96 или аналогичный).

Стандартный раствор А мышьяка с концентрацией 1000 мкг/л. 1 мл ГСО мышьяка с концентрацией ионов мышьяка 0,1 мг/мл помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствором азотной кислоты 1 % до метки и перемешивают.

Стандартный раствор Б мышьяка с концентрацией 10 мкг/мл. 1 мл стандартного раствора А мышьяка с концентрацией ионов мышьяка 1000 мкг/л помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствором азотной кислоты 1 % до метки и перемешивают.

Стандартный раствор В мышьяка с концентрацией 20 мкг/мл. 2 мл стандартного раствора А мышьяка с концентрацией ионов мышьяка 1000 мкг/л помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствором азотной кислоты 1 % до метки и перемешивают.

Стандартный раствор Г мышьяка с концентрацией 30 мкг/мл. 3 мл стандартного раствора А мышьяка с концентрацией ионов мышьяка 1000 мкг/л помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствором азотной кислоты 1 % до метки и перемешивают.

При необходимости используют стандартные растворы других концен-

траций.

Построение калибровочного графика, измерение концентрации элемента в испытуемом растворе и растворе контрольного опыта проводят согласно инструкции по эксплуатации атомно-абсорбционного спектрометра.

Для проведения измерений используют наиболее чувствительные линии поглощения элементов со следующими длинами волн: медь – 324,8 нм; свинец – 283,3 нм; цинк –307,6 нм; мышьяк – 193,7 нм. В качестве источника излучения используют лампы с полым катодом на медь, мышьяк, свинец, цинк.

Содержание определяемых элементов в субстанции в процентах (X, %) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(C_x - C_к) \cdot V \cdot N}{a \cdot 10^4},$$

где C_x - концентрация элемента в испытуемом растворе, мкг/л;

N – разведение испытуемого раствора;

$C_к$- концентрация элемента в растворе контрольного опыта, мкг/л;

V - исходный объем испытуемого раствора, л;

a - навеска испытуемой субстанции, г;

10^4 – коэффициент пересчета мкг/г в проценты.

Ртуть. Не более 0,00003 %.

Испытание проводят атомно-абсорбционным методом.

Приготовление растворов.

Растворы калия дихромата.

Основной раствора калия дихромата. 20 г калия дихромата растворяют в 50 мл воды в мерной колбе вместимостью 500 мл, прибавляют 50 мл азотной кислоты концентрированной, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Срок хранения раствора в темной склянке с притертой пробкой 6 месяцев.

Фоновый раствор калия дихромата. 5 мл основного раствора калия дихромата помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Фоновый раствор используется для разбавления рабочих и калибровочных растворов. Срок хранения раствора в темной склянке с притертой пробкой 1 месяц.

Стандартные раствора ртути готовят разведением ГСО ртути с концентрацией ионов ртути 1 мг/мл (ГСО 7343-96 или аналогичный).

Стандартный раствор А ртути с концентрацией 10000 мкг/л. 1 мл ГСО ртути с концентрацией ионов ртути 1 мг/мл помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем фоновым раствором до метки и перемешивают.

Стандартный раствор Б ртути с концентрацией 100 мкг/л. 1 мл стандартного раствора А ртути с концентрацией ртути 10000 мкг/л помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем фоновым раствором до метки и перемешивают.

Стандартный раствор В ртути с концентрацией 10 мкг/л. 10 мл стандартного раствора Б ртути с концентрацией ртути 100 мкг/л помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем фоновым раствором до метки и перемешивают.

Калибровочные растворы готовят в день проведения анализа.

Калибровочный раствор 1. 10 мл стандартного раствора В ртути с концентрацией ртути 10 мкг/л, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, содержимое колбы доводят фоновым раствора до метки и перемешивают (концентрация ртути в калибровочном растворе 1,0 мкг/л).

Калибровочный раствор 2. 5 мл стандартного раствора В ртути с концентрацией ртути 10 мкг/л, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, содержимое колбы доводят фоновым раствора до метки и перемешивают (концентрация ртути в калибровочном растворе 0,5 мкг/л).

Калибровочный раствор 3. 2 мл стандартного раствора В ртути с концентрацией ртути 10 мкг/л, помещают в мерную колбу вместимостью 100

мл, содержимое колбы доводят фоновым раствора до метки и перемешивают (концентрация ртути в калибровочном растворе 0,2 мкг/л).

Калибровочный раствор 4. 1 мл стандартного раствора В ртути с концентрацией ртути 10 мкг/л, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, содержимое колбы доводят фоновым раствора до метки и перемешивают (концентрация ртути в калибровочном растворе 0,1 мкг/л).

Хлористоводородная кислота разведенная. 20 г хлористоводородной кислоты концентрированной, свободной от тяжелых металлов, растворяют в мерной колбе вместимостью 100 мл в 70 мл воды, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Восстанавливающий реагент. 50 г олова(II) хлорида растворяют в мерной колбе вместимостью 500 мл в 100 мл хлористоводородной кислоты разведенной, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (концентрация олова(II) хлорида 10 г/л). Раствор используют свежеприготовленным.

Испытуемый раствор. Около 1 г (точная навеска) субстанции помещают в круглодонную колбу для деструкции вместимостью 250 мл для проведения «мокрой» минерализации, прибавляют 20 мл смеси азотной кислоты концентрированной и серной кислоты концентрированной в соотношении (1 : 1) по объему. Колбу соединяют с обратным холодильником и выдерживают в водяной бане с температурой (60 ÷ 70) °С в течение 15 мин. Затем колбу помещают в кипящую водяную баню на 5 мин. По истечении указанного срока в колбу через обратный холодильник осторожно по каплям прибавляют 30 мл воды, и оставляют на кипящей водяной бане в течение 60 мин. Минерализацию проводят до осветления придонного слоя.

По окончании минерализации колбу удаляют из бани, охлаждают и промывают 10 мл горячей воды. Реакционную смесь фильтруют через фильтр смоченный фоновым раствором, в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят содержимое колбы этим же раствором до метки и перемешива-

ют. Одновременно проводят контрольный опыт, добавляя те же реактивы, в условиях аналогичных проведения минерализации испытуемой субстанции.

Анализ проводят с помощью подходящего оборудования, например атомно-абсорбционного спектрометра с электротермическим атомизатором с использованием генератора ртутно-гидридного в качестве приставки по методу «холодного пара». Допускается использование альтернативного оборудования, обеспечивающего определение ртути в приведенном диапазоне концентраций калибровочных растворов с уточнением параметров выполняемого определения.

Построение калибровочного графика, измерение концентрации элемента в испытуемом растворе и растворе контрольного опыта проводят согласно инструкции по эксплуатации атомно-абсорбционного спектрометра.

Для проведения измерений используют линию поглощения ртути - 253,7 нм. В качестве источника излучения используют ртутную лампу с полым катодом. В емкости – стаканы ртутно-гидридного генератора перед измерением помещают по 10 мл фонового, испытуемого, стандартных растворов и по 1,5 мл раствора олова(II) хлорида.

Содержание ртути в субстанции в процентах (X, %) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(C_x - C_к) \cdot V}{a \cdot 10^4}$$

где C_x –концентрация ртути в испытуемом растворе, мкг/л;

$C_к$ – концентрация ртути в растворе контрольного опыта, мкг/л;

a – навеска испытуемой субстанции, г;

V – исходный объем раствора, полученный после пробоподготовки, л;

10^4 – коэффициент пересчета из мкг/г в %.

Остаточные количества пестицидов. Определение проводят методом газо-жидкостной хроматографии в соответствии с требованиями ОФС «Определение остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Содержание хлорорганических пестицидов не должно превышать **0,05 мг/кг.**

Приготовление растворов.

Стандартные растворы хлорорганических пестицидов. Около 5 ÷ 10 мг (точная навеска) каждого из стандартных образцов: α-гексахлорциклогексана, β-гексахлорциклогексана, γ-гексахлорциклогексана, 4,4'-дихлордифенилхлорэтилен, 4,4'-дихлордифенилдихлорметилметан; 4,4'-дихлордифенилтрихлорметилметан помещают в отдельные мерные колбы вместимостью 100 мл, растворяют в гексане, доводят объемы растворов тем же растворителем до метки и перемешивают. Концентрация каждого хлорорганического пестицида в основных растворах находится в интервале от 50 до 100 мкг/мл.

Промежуточный стандартный раствор смеси хлорорганических пестицидов. 5,0 мл основного стандартного раствора каждого хлорорганического пестицида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в гексане, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Концентрация каждого хлорорганического пестицида в промежуточном растворе находится в интервале от 2,50 до 5,0 мкг/мл.

Стандартный раствор. 2,0 мл промежуточного стандартного раствора смеси хлорорганических пестицидов помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в гексане, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Концентрация каждого хлорорганического пестицида в полученном растворе находится в интервале от 50,0 до 100,0 нг/мл.

Калибровка газового хроматографа. Для расчета коэффициента чувствительности детектора электронного захвата (ECD-детектора) и предела

обнаружения хлорорганических пестицидов вводят в хроматограф 1 мкл стандартного раствора. Коэффициент чувствительности ECD-детектора для каждого из определяемых хлорорганических пестицидов вычисляют по формуле:

$$K_i = \frac{C_i}{S_i},$$

где K_i – коэффициент чувствительности для каждого определяемого пестицида;

C_i – содержание каждого определяемого хлорорганического пестицида, нг;

S_i – площадь пика каждого определяемого хлорорганического пестицида на хроматограмме стандартного раствора.

Проверка пригодности хроматографической системы.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие требования:

- относительное стандартное отклонение площадей пиков хлорорганических пестицидов не должна превышать 3,0 %;

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику α-гексахлорциклогексана, должна быть не менее 2000 теоретических тарелок;

- фактор асимметрии пиков хлорорганических пестицидов должен составлять от 0,7 до 1,5;

- разрешение между пиками хлорорганических пестицидов должно быть не менее 1,5.

Пределом обнаружения пика пестицида считается высота пика, десятикратно превышающая уровень шума детектора.

Испытуемый раствор. Около 5 г (точная навеска) субстанции растворяют в 50 мл гексана, переносят в делительную воронку, прибавляют 30 мл серной кислоты концентрированной, осторожно перемешивают и после раз-

деления слоев сливают отработанную серную кислоту. Очистку повторяют до получения бесцветного кислотного слоя. Полученный раствор промывают двумя порциями по 15 мл натрия карбоната раствора 1 %, затем водой до нейтральной реакции, фильтруют через фильтр, содержащий натрия сульфат безводный, слой осушителя тщательно промывают гексаном и отжимают стеклянной пробкой. Объединенные гексановые растворы упаривают на роторном испарителе досуха, сухой остаток растворяют в 5 мл гексана (испытуемый раствор).

1 мкл испытуемого раствора вводят в газовый хроматограф и регистрируют хроматограмму в следующих условиях:

- газовый хроматограф, снабженный детектором электронного захвата (ECD-детектор);

- колонка кварцевая капиллярная длиной 25 м с внутренним диаметром 0,32 мм или аналогичная;

- неподвижная фаза SE-54 или аналогичная, толщина пленки 0,25 мкм;

- температура термостата колонки программируется в следующем режиме: от 0 до 2 мин при температуре 50 °С; от 2 до 7,5 мин программирование температуры от 50 °С до 160 °С; от 7,5 мин до 47,5 мин программирование температуры от 160 °С до 280 °С; от 47,5 мин до 62,5 мин при температуре 280 °С;

- температура инжектора – 290 °С;

- температура детектора – 320 °С;

- газ-носитель - азот особой чистоты;

- скорость расхода газа-носителя 2,0 мл/мин (через колонку), 4,0 мл/мин (через детектор);

- деление потока 1:20;

- объем вводимой пробы 1 мкл.

Порядок выхода хлорорганических пестицидов: α-гексахлорциклогексан, β-гексахлорциклогексан, γ-гексахлорциклогексан, 4,4’-дихлордифенилхлор-

этилен, 4,4’-дихлордифенилдихлорметилметан; 4,4’-дихлордифенилтрихлорметилметан.

Содержание каждого хлорорганического пестицида в субстанции в мг/кг вычисляют по формуле:

$$X = \frac{К_1 \cdot S_1 \cdot 5}{1000 \cdot 1 \, a}$$

где $К_1$ – коэффициент чувствительности детектора для каждого определяемого хлорорганического пестицида;

S_1 – площадь пика каждого определяемого хлорорганического пестицида на хроматограмме испытуемого раствора;

5 – объем испытуемого раствора,

а – навеска субстанции, г;

1 – вводимый объем испытуемого раствора, мкл;

1000 – коэффициент пересчета.

Полученные количества каждого определяемого хлорорганического пестицида суммируют.

Результаты определения считаются достоверными, если выполняется проверка пригодности хроматографической системы.

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. **Ретинол. Колекальциферол**. **Состав жирных кислот.** Содержание ретинола должно быть от 350 МЕ до 1000 МЕ в 1 г; содержание колекальциферола должно быть от 50 МЕ до 100 МЕ в 1 г; содержание эйкозопентаеновой кислоты должно быть не менее 13 %; докозагексаеновой кислоты – не менее 9 %; сумма полиненасыщенных жирных кислот – не менее 28 %.

Ретинол.

Испытание проводят методом спектрофотометрии.

Приготовление растворов

Натрия хлорида раствор 1 %. 2,5 г натрия хлорида помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

Испытуемый раствор. Около 1 г (точная навеска) субстанции помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 3 мл свежеприготовленного калия гидроксида 50 %, 30 мл этанола безводного и кипятят с обратным холодильником в течение 30 мин, быстро охлаждают и прибавляют 30 мл натрия хлорида раствор 1 %. Экстрагируют эфиром три раза по 50 мл, и после полного разделения слоев отбрасывают нижний слой. Объединенные верхние слои промывают четыре раза по 50 мл натрия хлорида раствором 1 %, фильтруют через бумажный фильтр с 5 г натрия сульфата безводного и отгоняют органический растворитель с помощью роторного испарителя при температуре не выше 30 °С при пониженном давлении досуха. Сухой остаток растворяют в 100 мл 2-пропанола.

Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора с помощью спектрофотометра при длинах волн 300 нм, 310 нм, 325 нм и 334 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения 2-пропанол.

Содержание ретинола (полностью перешедшего в транс-форму) в субстанции в МЕ/г вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A_{325} \cdot V \cdot 1821}{100 \cdot a},$$

где

A_{325} – оптическая плотность при длине волны 325 нм;

V – общий объем испытуемого раствора, мл;

1821 – коэффициент пересчета удельного показателя поглощения ретинола, полностью перешедшего в транс-форму, МЕ;

а – навеска субстанции, г.

Вышеприведенная формула может быть использована, только если A_{325} имеет значение, не превышающее $A_{325скорр}/0,970$, где: $A_{325скорр}$ - скорректированная оптическая плотность при длине волны 325 нм.

Скорректированную оптическую плотность ($A_{325скорр}$) вычисляют по формуле:

$A_{325скорр} = 6,815 \cdot A_{325} - 2,555 \cdot A_{310} - 4,260 \cdot A_{334}$, где

A_{325}, A_{310} A_{334} – оптические плотности при длинах волн 310 нм, 325 нм, 334 нм соответственно.

Если A_{325} имеет значение, превышающее $A_{325скорр}/0{,}970$, содержание ретинола (полностью перешедшего в транс-форму) в субстанции в МЕ/г вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A_{325скорр} \cdot V \cdot 1821}{100 \cdot a}.$$

Результаты количественного определения считаются достоверными, если:

- в УФ-спектре испытуемого раствора наблюдается максимум поглощения при длине волны (325 ± 2) нм;

- отношение оптической плотности при длине волны 300 нм к оптической плотности при длине волны 325 нм менее 0,73.

Колекальциферол.

Испытание проводят методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, выполняя все операции быстро, избегая воздействия солнечного света и воздуха.

Приготовление растворов

Раствор бутилгидрокситолуола в гексане. 1 г бутилгидрокситолуола помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 80 мл гексана, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Калия гидроксида раствор 80 %. 80 г калия гидроксида растворяют в воде и доводят объем раствора водой до 100 мл.

Калия гидроксида раствор 3 % в этаноле 10 %. 6 г калия гидроксида помещают в мерную колбу вместимостью 200 мл, растворяют в 100 мл воды, прибавляют 20 мл этанола безводного, перемешивают, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Аскорбиновой кислоты раствор 10 %. 2,5 г аскорбиновой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 15 мл воды, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

*Натрия хлорида раствор 1 %.*10 г натрия хлорида помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор стандартного образца колекальциферола. Около 0,015 г (точная навеска) СО колекальциферола растворяют в мерной колбе вместимостью 50 мл в этаноле безводном, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. 1 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора этанолом безводным до метки и перемешивают.

Исходный испытуемый раствор. Около 10 г (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 30 мл гексана, доводят объем раствора гексаном до метки и перемешивают.

Испытуемый раствор 1. 20,0 мл исходного испытуемого раствора помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 5 мл свежеприготовленного аскорбиновой кислоты раствора 10 %, 10 мл свежеприготовленного калия гидроксида раствора 80 %, 100 мл этанола безводного, перемешивают и кипятят на водяной бане с обратным холодильником в течение 45 мин в инертной атмосфере. К горячему раствору прибавляют 100 мл натрия хлорида раствора 1 % и охлаждают под струей холодной воды до комнатной температуры. Полученный раствор количественно переносят в делительную воронку вместимостью 500 мл при помощи 75 мл натрия хлорида раствора 1 %, а затем 150 мл смеси эфир-гексан (2 : 1). Содержимое воронки встряхивают в течение 1 мин. После полного разделения нижний слой отделяют, а верхний осторожно, избегая сильного встряхивания, промывают сначала 50 мл калия гидроксида раствором 3 % в этаноле 10 %, а затем – натрия хлорида раствором 1 % три раза по 50 мл. Верхний слой фильтруют через бумажный фильтр с натрия сульфата безводного в круглодонную колбу (для ротационного испарителя). Делительную воронку промывают 10 мл смеси эфир-гексан (2:1) и также фильтруют через бумажный фильтр с натрия сульфата безводного в круглодонную колбу (для ротационного испарителя). Отгоняют растворитель с помощью ротационного испарителя при пониженном давлении в токе инертного газа и температуре не выше 30 °С досуха. Сухой остаток растворяют в 1,5 мл подвижной фазы (подраздел «Очистка»).

Испытуемый раствор 2. К 20,0 мл исходного испытуемого раствора прибавляют 20 мл гексана и далее поступают так, как указано в методике приготовления испытуемого раствора 1, начиная со слов «… помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл ….».

Раствор сравнения. К 5 мл раствора стандартного образца колекальциферола прибавляют 20 мл гексана и далее поступают так, как указано в методике приготовления испытуемого раствора 1, начиная со слов «… помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл ….».

Очистка.

Условия хроматографирования:

- жидкостной хроматограф с УФ-детектором;
- аналитическая длина волны – 265 нм;

- хроматографическая колонка длиной 0,25 м, диаметр 4,6 мм, неподвижная фаза силикагель нитрильный (10 мкм);

- подвижная фаза – изоамиловый спирт – гексан (1,69 : 98,4);

- скорость потока подвижной фазы 1,1 мл/мин;

- температура колонки – 25 °С.

350 мкл раствора сравнения вводят в инжектор хроматографа. Элюат начинают собирать за 2 мин до наступления и в течение 2 мин после наступления времени удерживания холекальциферола в пробирку с притертой пробкой, содержащую бутилгидрокситолуола в гексане. Процедуру повторяют с испытуемыми растворами 1 и 2. Из каждой пробирки удаляют растворитель током азота при температуре не выше 30 °С. Каждый из полученных остатков растворяют в 1,5 мл ацетонитрила.

Условия хроматографирования:

- жидкостной хроматограф с УФ-детектором;

- аналитическая длина волны – 265 нм;

- хроматографическая колонка длиной 0,15 м, диаметр 4,6 мм, неподвижная фаза силикагель октадецилсилильный для хроматографии (5 мкм);

- подвижная фаза – ацетонитрил (для ВЭЖХ) – фосфорная кислота концентрированная (99,8 : 0,2);

- скорость потока подвижной фазы 1,0 мл/мин;

- температура колонки – 25 °С.

Проверка пригодности хроматографической системы.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- относительное стандартное отклонение площади пика колекальциферола на хроматограмме раствора сравнения не должно превышать 5 %;

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику колекальциферола, должна составлять не менее 1000 теоретических тарелок;

- фактор асимметрии пика колекальциферола должен составлять от 0,7 до 1,5.

В инжектор хроматографа вводят не более 50 мкл каждого из трех растворов, полученных в результате очистки, и хроматографируют в указанных

выше условиях.

Содержание колекальциферола в субстанции в международных единицах (X, МЕ) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_o \cdot 1 \cdot 5 \cdot 50 \cdot 40000}{S_o \cdot a \cdot 20 \cdot 50 \cdot 100} = \frac{S \cdot a_o \cdot 100}{S_o \cdot a},$$

где

S – площадь пика колекальциферола на хроматограмме испытуемого раствора (1, 2);

S_o – площадь пика колекальциферола на хроматограмме раствора сравнения;

a_o – навеска стандартного образца колекальциферола, мг;

a – навеска субстанции, взятая для определения, мг;

40000 – коэффициент пересчета мг колекальциферола в МЕ.

Состав жирных кислот.

Испытание проводят методом газовой хроматографии.

Приготовление растворов.

Натрия метилата раствор.4,6 г натрия небольшими порциями растворяют в 100 мл метанола.

Испытуемый раствор. 100 мг субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 15 мл гексана, прибавляют 1,25 мл метилата натрия раствора и подвергают полученный раствор воздействию ультразвука при 40 °С в течение 15 мин. Затем раствор охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора гексаном до метки и тщательно перемешивают. Отделяют верхний гексановый слой и фильтруют через бумажный фильтр («белая лента»), отбрасывая первые 5 – 10 мл фильтрата. Полученный фильтрат помещают в делительную воронку объемом 100 мл, прибавляют 10 мл воды, тщательно перемешивают и после разделения слоев нижний водный слой сливают. Процедуру повторяют дважды. Промытый таким образом гексановый слой фильтруют через бумажный фильтр («белая лента»), содержания натрия сульфат безводный.

Раствор стандартных образцов. 25 мг метилового эфира эйкозопентаеновой кислоты и 20 мг метилового эфира докозагексаеновой кислоты растворяют в 10 мл гексана.

Проверка пригодности хроматографической системы. Для проверки пригодности хроматографической системы хроматографируют раствор стан-

дартных образцов, получая не менее 5 хроматограмм в указанных ниже условиях.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- относительное стандартное отклонение, рассчитанное для площадей пиков метиловых эфиров эйкозопентаеновой и докозагексаеновой кислот на хроматограммах раствора стандартных образцов должно быть не более 2 %;

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику метилового эфира эйкозопентаеновой кислоты, должна быть не менее 50000 теоретических тарелок;

- разрешение между пиками эйкозопентановой и докозагексановой кислот должно быть не менее 20.

Условия хроматографирования:

- газовый хроматограф с пламенно-ионизационным детектором;

- колонка капиллярная с неподвижной фазой поли(диметил)(дифенил)-силоксан размером 30 м × 0,32 мм; толщина слоя 0,1 мкм;

- объем вводимой пробы 0,2 мкл;

- газ-носитель гелий для хроматографии;

- скорость газа-носителя 20 см/с;

- деление потока 1 : 50;

- температура инжектора 270 °С;

- температура детектора 300 °С;

- программа температуры: начальная температура 180 °С, выдержка при начальной температуре – 8 мин; подъем до 280 °С со скоростью 5 °С/мин, выдержка при конечной температуре – 5 мин.

Относительное время удерживания метилового эфира эйкозопентаеновой кислоты (относительно метилого эфира докозагексаеновой кислоты) составляет около 0,77 – 0,83.

По 0,2 мкл испытуемого раствора и раствора стандартных образцов хроматографируют попеременно в указанных выше условиях, получая не менее 3 хроматограмм.

Содержание эйкозопентаеновой кислоты или докозагексаеновой кисло-

ты вычисляют методом внутренней нормализации.

Содержание суммы полиненасыщенных кислот вычисляют, учитывая пики метиловых эфиров жирных кислот с относительным временем удерживания от 0,7 до 1,2 (относительно метилого эфира докозагексаеновой кислоты).

Хранение. В защищенном от света месте при температуре не выше 8 °С.

Азарум эуропеум **ФС.2.6.0001.18**

Asarum europaeum

Настойка гомеопатическая матричная **Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Азарум эуропеум - Asarum europaeum настойку гомеопатическую матричную, получаемую из свежих корневищ с корнями копытня европейского - *Asarum europaeum* L. сем. кирказоновых - *Aristolochiaceae*, применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Для получения настойки необходимо

Копытня европейского корневищ с корнями свежих	- 100 г
Спирта этилового 86 % (м/м) или 90 % (о/о)	- достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляют по способу 3 ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Описание

Прозрачная жидкость от коричневого до зеленовато-коричневого цвета с сильным характерным ароматным запахом.

Подлинность

Приготовление растворов

Раствор стандартного образца (СО) ментола. Около 0,1 г СО ментола растворяют в 10 мл спирта 70 % и перемешивают. Срок годности раствора 30 сут.

1. Тонкослойная хроматография

Около 5 мл настойки помещают в делительную воронку вместимостью 50 мл, прибавляют 10 мл *н*-гексана и встряхивают в течение 3 мин. Гексановое извлечение сливают в круглодонную колбу вместимостью 50 мл. Экстракцию проводят повторно таким же количеством *н*-гексана и сливают в ту же колбу. Объединенные извлечения выпаривают с помощью роторного испарителя при температуре не выше 50 °С досуха. Сухой остаток растворяют в 1 мл этилацетата (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 10 мкл испытуемого раствора и 5 мкл раствора СО ментола. Пластинку помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 20 мин смесью растворителей толуол - этилацетат (8:2) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат на воздухе при комнатной температуре до удаления следов растворителей, затем обрабатывают анисового альдегида раствором уксуснокислым в этаноле и нагревают при температуре 100 – 105 °С в течение 5 мин и просматривают в дневном свете.

На хроматограмме раствора СО ментола должна обнаруживаться зона красновато-фиолетового цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться следующие зоны адсорбции: зоны фиолетового и светло-фиолетового цвета; бледно-фиолетового цвета, фиолетового цвета и зона фиолетового цвета на уровне зоны СО ментола, ярко-фиолетового и бледно-фиолетового цвета; допускается обнаружение других зон розово-фиолетового или фиолетового цвета.

2. К 1 мл настойки прибавляют 5 мл воды и 1 мл железа(III) хлорида раствора 5 %; должно наблюдаться темно-зелёное окрашивание (фенольные соединения).

3. К 1 мл настойки прибавляют по 0,5 мл натрия гидроксида раствора 10 %, 0,5 мл пикриновой кислоты раствора насыщенного, нагревают в

течение нескольких минут на кипящей водяной бане; должно появляться темно-красное окрашивание (гликозиды).

4. К 2 мл настойки, прибавляют 1 мл серебра нитрата аммиачного раствора 5 %; должен появляться коричневый осадок, изменяющий цвет на черный в течение 4 мин (α-азарон и другие фенилпропаноиды).

5. К 1 мл настойки прибавляют 2 мл серной кислоты концентрированной; должно появляться помутнение (α-азарон и другие фенилпропаноиды).

Сухой остаток. Не менее 1,0 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,895 до 0,920 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание суммы фенилпропаноидов в пересчете на α-азарон в настойке должно быть не менее 0,015 %.

Около 5,0 г (точная навеска) настойки помещают в делительную воронку вместимостью 50 мл, прибавляют 10 мл гексана, встряхивают в течение 10 мин. Гексановое извлечение сливают в круглодонную колбу вместимостью 50 мл. Экстракцию проводят повторно с таким же количеством гексана. Извлечения объединяют и отгоняют с помощью роторного испарителя при температуре не выше 40 °С досуха. Сухой остаток растворяют в 5 мл спирта 70 % и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл. Круглодонную колбу двукратно споласкивают по 5 мл спирта 70 %, переносят в ту же мерную колбу, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор А).

Измеряют оптическую плотность раствора А на спектрофотометре при длине волны 315 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют спирт 70 %.

Содержание фенилпропаноидов в пересчете на α-азарон (*X*) в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 50}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a}$$

где $A_{1\text{см}}^{1\%}$ - удельный показатель поглощения α-азарона при длине волны 315 нм, равный 290,5;

A- оптическая плотность раствора А;

a – навеска настойки, г.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Аконитум напеллюс **ФС.2.6.0002.18**
Аконитум
Aconitum napellus
Aconitum **Взамен ФС 42-0202-07**
Настойка гомеопатическая матричная

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Аконитум напеллюс (Аконитум) - Aconitum napellus (Aconitum) настойку гомеопатическую матричную, получаемую из собранного во время цветения целого свежего растения аконита аптечного – *Aconitum napellus* L. s.l., сем. лютиковых – *Ranunculaceae,* применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Для получения настойки необходимо:

Аконита аптечного травы с корнями и корневищами свежей - 100 г

Спирта этилового 86 % (м/м) или 90 % (о/о) - достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляется по способу 2 ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Описание

Прозрачная жидкость от зеленовато-коричневого до коричневого цвета со своеобразным запахом.

Подлинность

Приготовление раствора стандартного образца (СО) атропина сульфата. Около 0,1 г СО атропина сульфата, растворяют в 10 мл спирта 96 %. Срок годности растворов 30 сут.

1. Тонкослойная хроматография

Около 15 мл настойки помещают в делительную воронку вместимостью 50 мл, прибавляют 5 мл воды, 1 мл аммиака раствора концентрированного, 20 мл эфира и встряхивают в течение 10 мин. Экстракцию повторяют еще раз с 10 мл эфира. Эфирные извлечения отделяют, объединяют, помещают в делительную воронку вместимостью 50 мл и промывают 20 мл воды, осторожно взбалтывая, затем отделяют эфирное извлечение и фильтруют через бумажный складчатый фильтр с 2,0 г натрия сульфата безводного в круглодонную колбу. Растворитель отгоняют с помощью роторного испарителя при нагревании на кипящей водяной бане. Сухой остаток растворяют в 2 мл спирта 96 % (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 20 мкл испытуемого раствора полосой длиной 10 мм и 2 мкл раствора СО атропина сульфата в виде точки. Пластинку сушат на воздухе в течение 15 мин и помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 40 мин смесью растворителей ацетон – уксусная кислота ледяная – вода в соотношении (42:8:10) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, обрабатывают реактивом Драгендорфа и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО атропина сульфата должна обнаруживаться зона адсорбции оранжевого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться (по возрастанию от линии старта): 2-3 зоны оранжевого цвета ниже зоны СО атропина сульфата, 2 зоны оранжевого цвета выше зоны СО атропина сульфата, допускается обнаружение зоны желтого цвета выше зон оранжевого цвета, одной – двух слабо окрашенных зон зеленоватого цвета у линии фронта растворителей.

2. К 2 мл настойки прибавляют 0,2 мл железа(III) хлорида раствора; должно наблюдаться черно-зеленое окрашивание (фенольные вещества).

3. К 1 мл настойки прибавляют 0,5 мл натрия гидроксида раствора 10 %, 0,5 мл пикриновой кислоты насыщенного раствора, нагревают в течение нескольких минут на кипящей водяной бане; должно наблюдаться темное коричнево-красное окрашивание (сахара, полисахариды, гликозиды).

4. К 1 мл настойки прибавляют 1,5 мл уксусного ангидрида, перемешивают; в УФ-свете при длине волны 365 нм должна наблюдаться сине-зеленая или зеленая флуоресценция (алкалоиды).

Сухой остаток. Не менее 2 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,930 до 0,960 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание суммы алкалоидов в пересчете на аконитин в настойке должно быть от 0,03 % до 0,12 %.

Около 10,0 г (точная навеска) настойки помещают в делительную воронку вместимостью 150 мл, прибавляют 5 мл воды, 1 мл аммиака раствора концентрированного 32 %, 20 мл эфира и встряхивают в течение 10 мин. Экстракцию повторяют еще раз с 20 мл эфира. Эфирные извлечения отделяют, объединяют, помещают в делительную воронку и промывают 20 мл воды, взбалтывают осторожно, затем отделяют и фильтруют через бумажный складчатый фильтр с 2 г натрия сульфата безводного в круглодонную колбу. Фильтр промывают 5 мл эфира, который присоединяют к извлечению. Растворитель отгоняют с помощью роторного испарителя при

нагревании на кипящей водяной бане досуха. Сухой остаток растворяют в 20 мл (порциями по 10 мл) спирта 70 % и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивают (раствор А).

2,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивают (раствор Б).

Измеряют оптическую плотность раствора Б на спектрофотометре при длине волны 230 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют спирт 70 %.

Содержание суммы алкалоидов в пересчете на аконитин в настойке в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 25 \cdot 25}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 2},$$

где *A* – оптическая плотность раствора Б;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения аконитина при длине волны 230 нм, равный 219;

a – навеска испытуемой настойки, г.

Испытание четвертого десятичного разведения (D4). К 1 мл четвертого десятичного разведения прибавляют 1,5 мл уксусного ангидрида, перемешивают; в УФ-свете при длине волны 365 нм не должно быть зеленой или зелено-голубой флуоресценции или она должна быть едва заметна.

Примечание

Приготовление четвертого десятичного разведения D4 производят в соответствии с ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Хранить с осторожностью.

Аконитум зоонгарикум (4) **ФС.2.6.0003.18**

Aconitum soongaricum (4) **Вводится впервые**

Настойка гомеопатическая матричная

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Аконитум зоонгарикум (4) - Aconitum soongaricum (4) настойку гомеопатическую матричную, получаемую из высушенных корневищ с корнями аконита джунгарского – *Aconitum soongaricum* Stapf., сем. лютиковых – *Ranunculaceae,* применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Для получения настойки необходимо:

Аконита джунгарского корневищ с корнями высушенных (измельченных до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,7 мм)	- 100 г
Спирта этилового 62 % (м/м) или 70 % (о/о)	- достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляется по способу 4 ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Описание

Прозрачная жидкость от зеленовато-коричневого до коричневого цвета со своеобразным запахом.

Подлинность

Приготовление раствора стандартного образца (СО) атропина сульфата. Около 0,1 г СО атропина сульфата, растворяют в 10 мл спирта 96 %. Срок годности раствор 30 сут.

1. Тонкослойная хроматография

Около 15 мл настойки помещают в делительную воронку вместимостью 50 мл, прибавляют 5 мл воды, 1 мл аммиака раствора концентрированного, 20 мл эфира и встряхивают в течение 10 мин. Экстракцию повторяют еще раз с 10 мл эфира. Эфирные извлечения отделяют, помещают в делительную воронку и промывают 20 мл воды, осторожно взбалтывая, затем отделяют и фильтруют через бумажный складчатый фильтр с 2,0 г натрия сульфата безводного в круглодонную колбу. Растворитель отгоняют с помощью роторного испарителя под вакуумом при нагревании на кипящей водяной бане досуха. Сухой остаток растворяют в 2 мл спирта 96 % (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 20 мкл испытуемого раствора и 2 мкл раствора СО атропина сульфата. Пластинку сушат на воздухе в течение 15 мин и помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 40 мин смесью растворителей ацетон – уксусная кислота ледяная – вода в соотношении (42:8:10) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат при температуре 100 - 105°С в течение 10 мин, обрабатывают реактивом Драгендорфа и рассматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО атропина сульфата должна обнаруживаться зона адсорбции оранжевого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться выше зоны адсорбции атропина сульфата (по возрастанию) две зоны оранжевого цвета, допускается обнаружение зоны желтого цвета, одной – двух слабо окрашенных зон зеленоватого цвета почти на линии фронта растворителей. Обнаружение зон адсорбции оранжевого цвета ниже уровня СО атропина сульфата не допустимо.

2. К 2 мл настойки прибавляют 0,2 мл железа(III) хлорида раствора; должно наблюдаться черно-зеленое окрашивание (фенольные вещества).

3. К 1 мл настойки прибавляют 0,5 мл натрия гидроксида раствора 10 %, 0,5 мл пикриновой кислоты насыщенного раствора, нагревают в течение нескольких минут на кипящей водяной бане; должно наблюдаться темное коричнево-красное окрашивание (сахара, полисахариды, гликозиды).

4. К 1 мл настойки прибавляют 1,5 мл уксусного ангидрида, перемешивают; в УФ-свете при длине волны 365 нм должна наблюдаться сине-зеленая или зеленая флуоресценция (алкалоиды).

Сухой остаток. Не менее 1,5 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,890 до 0,910 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки».

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание суммы алкалоидов в пересчете на аконитин в настойке должно быть не менее 0,05 % и не более 0,12 %.

Около 10,0 г (точная навеска) настойки помещают в делительную воронку вместимостью 100 мл, прибавляют 5 мл воды, 1 мл аммиака раствора концентрированного 32 %, 20 мл эфира и встряхивают в течение 10 мин. Экстракцию повторяют еще раз с 20 мл эфира. Эфирные извлечения отделяют, помещают в делительную воронку и промывают 20 мл воды, взбалтывают осторожно, затем отделяют и фильтруют через бумажный складчатый фильтр с 2 г натрия сульфата безводного в круглодонную колбу. Фильтр промывают 5 мл эфира, который присоединяют к извлечению. Растворитель отгоняют под вакуумом с помощью роторного испарителя при нагревании на кипящей водяной бане досуха. Сухой остаток растворяют в

20 мл (порциями по 10 мл) спирта 70 % и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивают (раствор А).

2,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивают (раствор Б).

Измеряют оптическую плотность раствора Б на спектрофотометре при длине волны 230 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно спирта 70 %.

Содержание суммы алкалоидов в пересчете на аконитин в настойке в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 25 \cdot 25}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 2},$$

где *A* – оптическая плотность раствора Б;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения аконитина при длине волны 230 нм, равный 219;

a – навеска настойки, г.

Испытание четвертого десятичного разведения (D4). К 1 мл четвертого десятичного разведения прибавляют 1,5 мл уксусного ангидрида, перемешивают; в УФ-свете при длине волны 365 нм не должно быть зеленой или зелено-голубой флуоресценции или она должна быть едва заметна.

Примечание

Приготовление четвертого десятичного разведения D4 производят в соответствии с ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Хранить с осторожностью.

Алхемилла вульгарис **ФС.2.6.0004.18**

Алхемилла (4)

Alchemilla vulgaris

Alchemilla (4)

Настойка гомеопатическая матричная **Взамен ФС 42-0164-06**

Настоящая фармакопейная статья распространяются на Алхемилла вульгарис (Алхемилла) (4) - Alchemilla vulgaris (Alchemilla) (4) настойку гомеопатическую матричную, получаемую из собранной в течение всего вегетационного периода и высушенной травы манжетки обыкновенной - *Alchemilla vulgaris L.,* сем. розоцветных - *Rosaceae* применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Для получения настойки необходимо:

Манжетки обыкновенной травы высушенной - 100 г

Спирта этилового 62 % (м/м) или 70 % (о/о) - достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляется по способу 4 ОФС «Настойки гомеопатические матричные»

Описание. Прозрачная жидкость от зеленовато-коричневого до коричневого цвета, со слабым ароматным запахом.

Подлинность

1. Тонкослойная хроматография

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 10 мкл настойки и 2 мкл раствора СО лютеолин-7-глюкозида (см. «Количественное определение»). Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 40 мин смесью растворителей этилацетат - муравьиная кислота безводная - вода (8:1:1) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и обрабатывают алюминия хлорида раствором 3 % в спирте 96 %, сушат при комнатной температуре и рассматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО лютеолин-7-глюкозида должна обнаруживаться зона желто-коричневого цвета.

На хроматограмме испытуемой настойки должны обнаруживаться зоны (по возрастанию) желто-коричневого цвета, коричневого цвета на уровне зоны адсорбции СО лютеолин-7-глюкозида, серого цвета, голубого цвета, красного цвета. Допускается обнаружение других зон желтого цвета.

2. К 2 мл настойки прибавляют 0,2 мл раствора железа(III) хлорида раствора 3 %; должно наблюдаться образование черно-зеленого окрашивания (дубильные вещества).

3. К 1 мл настойки прибавляют 1 мл спирта 70 %, 0,05 г магниевой стружки или 0,05 г порошка цинка и 1 мл хлористоводородной кислоты концентрированной; должно наблюдаться постепенное образование розового окрашивания (флавоноиды).

Сухой остаток. Не менее 1,5 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,890 до 0,910 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-глюкозид в настойке должно быть не менее 0,05 %.

Приготовление растворов.

Раствор СО лютеолин-7-глюкозида. Около 0,01 г (точная навеска) СО лютеолин-7-глюкозида, высушенного при температуре 100-105 °С в течение 1,5 ч, помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 20 мл спирта 70 %, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки, перемешивают (раствор А СО лютеолин-7-глюкозида). Срок годности раствора 30 сут при хранении в прохладном защищенном от света месте.

1,0 мл раствора А СО лютеолин-7-глюкозида, 3 мл алюминия хлорида раствора 3 % в спирте 70 %, 1 каплю уксусной кислоты раствора 3 % помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят спиртом 70 % до метки и перемешивают (раствор Б СО лютеолин-7-глюкозида). Срок годности раствора 30 сут при хранении в прохладном защищенном от света месте.

Около 7,0 г (точная навеска) настойки помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки, перемешивают (раствор А испытуемого раствора).

1,0 мл раствора А испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 3 мл алюминия хлорида раствора 3 % в спирте 70 %, 1 каплю уксусной кислоты раствора 3 %, доводят спиртом 70 % до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора).

Оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора измеряют через 40 мин при длине волны 400 нм, в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1,0 мл раствора А испытуемого раствора, 1 капли уксусной кислоты раствора 3 %, доведенный спиртом 70 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО лютеолин-7-глюкозида. В качестве раствора сравнения используют раствор,

состоящий из 1,0 мл раствор А СО лютеолин-7-глюкозида, 1 капли уксусной кислоты раствора 3 %, доведенный спиртом 70 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-глюкозид в настойке в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 25 \cdot 25 \cdot 1 \cdot 100 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot 1 \cdot 25 \cdot 25 \cdot 100},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
A_0 – оптическая плотность раствора Б СО лютеолин-7-глюкозида;
a_0 – навеска СО лютеолин-7-гликозида, г;
a – навеска настойки, г;
P – содержание основного вещества в СО лютеолин-7-глюкозида, %.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Анемоне немороза	**ФС.2.6.0005.18**
Anemone nemorosa	
Настойка гомеопатическая матричная	**Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Анемоне немороза - Anemone nemorosa настойку гомеопатическую матричную, получаемую из свежей травы ветреницы дубравной - *Anemone nemorosa* L., сем. лютиковых - *Ranunculaceae,* применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Для получения настойки необходимо:

Ветреницы дубравной травы свежей - 100 г

Спирта этилового 43 % (м/м) или 50 % (о/о) - достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляется по способу 3б ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Описание

Жидкость зеленовато-желтого цвета, со слабым своеобразным запахом, однородная по внешнему виду.

Подлинность

Приготовление растворов

Ванилина раствор 0,35 % в серной кислоте. 0,16 г ванилина растворяют в смеси 16 мл воды и 30 мл серной кислоты концентрированной. Раствор используется свежеприготовленным.

Нингидрина раствор 1 % в ацетоне. 1,0 г нингидрина растворяют в 100 мл ацетона. Срок годности раствора 60 сут.

1. Тонкослойная хроматография

а) На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 10 мкл настойки. Пластинку с нанесенной пробой помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин смесью растворителей ацетон - гексан (1:2) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат на воздухе в течение 5 мин, затем пластинку обрабатывают ванилина раствором 0,35 % в серной кислоте и выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100 – 105 °С в течение 5 мин.

На хроматограмме настойки должна обнаруживаться зона адсорбции красно-коричневого цвета (терпеноиды).

б) На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 10 мкл настойки. Пластинку с нанесенной пробой помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин смесью растворителей спирт *н*-бутиловый – уксусная кислота ледяная – вода (4:1:5) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат на воздухе в течение 5 мин, затем пластинку обрабатывают нингидрина раствором 1 % в ацетоне и выдерживают в сушильном шкафу при температуре 105 °С в течение 5 мин.

На хроматограмме настойки должны обнаруживаться 5 зон адсорбции розового или фиолетового цвета (аминокислоты).

2. К 3-5 мл настойки добавляют 3-5 капель реактива Фолина-Дениса и небольшое количество натрия карбоната безводного, перемешивают; должно наблюдаться фиолетово-синее окрашивание (дубильные вещества).

3. К 0,5 мл настойки прибавляют 10 мл воды и интенсивно встряхивают, образуется устойчивая пена (сапонины).

Сухой остаток. Не менее 0,3 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,870 до 0,889 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание суммы терпеноидов в пересчете на валтрат в настойке должно быть не менее 2,0 %.

Приготовление смеси уксусной кислоты ледяной и хлористоводородной кислоты концентрированной. К 36 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, отмеренной цилиндром, приливают 25 мл уксусной кислоты ледяной и встряхивают в течение 1 мин. Раствор используют свежеприготовленным.

Около 10,0 г (точная навеска) настойки помещают в делительную воронку вместимостью 250 мл, прибавляют 200 мл хлороформа, взбалтывают в течение 5 мин и фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 250 мл. Остаток на фильтре промывают два раза хлороформом по 20 мл. Отделяют хлороформную вытяжку и доводят объем раствора в колбе хлороформом до метки и перемешивают. 50 мл полученного хлороформного извлечения переносят в круглодонную колбу вместимостью 100 мл и выпаривают при температуре не выше 45 °С под вакуумом досуха. Сухой остаток растворяют в 50 мл смеси уксусной кислоты ледяной и хлористоводородной кислоты концентрированной, встряхивают в течение 20 мин и отстаивают 18 часов, после чего содержимое колбы фильтруют через стеклянный фильтр (ПОР 160).

Оптическую плотность полученного фильтрата измеряют на спектрофотометре при длине волны 595 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют смесь уксусной кислоты ледяной и хлористоводородной кислоты концентрированной.

Содержание суммы терпеноидов в пересчете на валтрат в процентах (X) вычисляют по формуле, используя калибровочный график:

$$X = \frac{C \cdot 250}{a \cdot 50},$$

где: С – содержание суммы терпеноидов в 1 мл испытуемого раствора, найденное по калибровочному графику, мг;
a – навеска испытуемой настойки, г.

Построение калибровочного графика.

Около 32,42 мг (точная навеска) 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, предварительно высушенного в течение 2 час при температуре 60 °С, растворяют в 2 мл фосфатного буферного раствора pH 8-9, тщательно растирая стеклянной палочкой. Затем раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 250 мл с помощью фосфатного буферного раствора pH 8-9 и доводят до метки этим же буфером (раствор А).

1 мл раствора А содержит 0,1297 мг 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, что соответствует 0,5 мг валтрата.

Из раствора А мерной колбой готовят растворы, разбавленные фосфатным буфером pH 8-9 в 2, 4, 8 раз, что соответствует содержанию валтрата 0,25; 0,125; 0,0625 мг в 1 мл.

Оптическую плотность полученных растворов измеряют на спектрофотометре при длине волны 595 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм. Калибровочный график строят, откладывая по оси абсцисс показатели содержания валтрата (мг в 1 мл), а на оси ординат – соответствующие величины оптической плотности.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Арника монтана **ФС.2.6.0006.18**
Арника

Arnica montana
Arnica
Настойка гомеопатическая матричная **Взамен ФС 42-0120-04**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Арника монтана (Арника) - Arnica montana (Arnica) настойку гомеопатическую матричную, получаемую из высушенных корневищ с корнями арники горной – *Arnica montana* L., сем. астровых – *Asteraceae*, применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Для получения настойки необходимо:

Арники горной корневищ с корнями высушенных (измельченных до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,7 мм)	- 100 г
Спирта этилового 86 % (м/м) или 90 % (о/о)	- достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляют по способу 4 ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Описание. Прозрачная жидкость желтого цвета с характерным запахом.

Подлинность.

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) тимола. 10,0 мг СО тимола растворяют в 10 мл спирта 96 %.

Растворы ванилина и серной кислоты. Реактив состоит из двух растворов, которыми последовательно обрабатывают пластинку.

Раствор № 1: 5,0 мл серной кислоты концентрированной смешивают с 95 мл спирта 96 %.

Раствор № 2: 1,00 г ванилина растворяют в 100 мл спирта 96 %.

Срок годности раствора 10 сут.

1. Тонкослойная хроматография.

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят раздельно полосами длиной 10 мм 20 мкл настойки и 10 мкл раствора СО тимола. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в хроматографическую камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин смесью растворителей гексан – этилацетат (90:10) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80-90 % от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат на воздухе до удаления следов растворителей и опрыскивают одним из реактивов: анисового альдегида раствором уксуснокислым в метаноле (А) или раствором ванилина и серной кислотой (Б).

А. Хроматограмму опрыскивают анисового альдегида раствором уксуснокислым в метаноле и выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100-105 ºС до появления окрашенных зон адсорбции и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО тимола должна обнаруживаться зона адсорбции розового цвета.

На хроматограмме испытуемой настойки должны обнаруживаться зоны адсорбции красно-фиолетового, серо-синего, голубого, сине-фиолетового, светло-розового и светло-фиолетового цвета ниже зоны адсорбции раствора СО тимола, светло-розового цвета на уровне зоны адсорбции на

хроматограмме раствора СО тимола, а также две зоны светло-розового цвета, по одной зоне светло-желтого, светло-зеленого, желтого, фиолетового, голубого цвета выше зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО тимола. Допускается обнаружение зоны коричневого цвета на линии старта.

При просмотре хроматограммы в УФ-свете при длине волны 365 нм на хроматограмме испытуемой настойки должны обнаруживаться зоны адсорбции с флюоресценцией розового, голубого, зеленого, синего, светло-голубого, розового цвета ниже уровня зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО тимола и светло-желтого, двух зон зеленого цвета, темно-синего, и двух зон адсорбции розового цвета выше уровня зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО тимола.

Б. Хроматограмму опрыскивают раствором ванилина и серной кислотой и выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100-105 ºС до появления окрашенных зон и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО тимола при дневном свете должна обнаруживаться зона адсорбции розового цвета.

На хроматограмме испытуемой настойки должны обнаруживаться зоны адсорбции красно-фиолетового, серо-коричневого, синего, красно-фиолетового цвета ниже уровня зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО тимола, светло-розового цвета на уровне уровня зоны адсорбции СО тимола, затем две зоны желтого цвета, фиолетового, розового, серого, голубого цвета выше зоны адсорбции СО тимола. Допускается обнаружение зоны коричневого цвета на линии старта.

При просмотре хроматограммы в УФ-свете при длине волны 365 нм на хроматограмме испытуемой настойки должны обнаруживаться зоны адсорбции с флюоресценцией розового, желтого, синего цвета, две зоны розового цвета ниже уровня зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО

тимола и две зоны желтого, одна зона ярко-желтого, темно-красного и две зоны розового цвета выше уровня зоны адсорбции раствора СО тимола.

2. 1 мл настойки помещают в выпарительную чашку и выпаривают на водяной бане досуха. К сухому остатку прибавляют 0,2 мл раствора ванилина и серной кислоты; появляется красно-коричневое окрашивание (терпеноиды).

3. К 1 мл настойки прибавляют 0,2 мл железа (III) хлорида раствора 3 %; образуется черно-зеленое окрашивание (дубильные вещества).

Сухой остаток. Не менее 0,8 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,833 до 0, 845 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание суммы сесквитерпеновых лактонов в пересчете на арнифолин в настойке должно быть не менее 1,2 %.

Приготовление растворов

0,05 М раствор хлористоводородной кислоты. 10,0 мл 0,5 М раствора хлористоводородной кислоты доводят водой до объема 100,0 мл. Раствор используют свежеприготовленным.

Около 2,0 г (точная навеска) настойки помещают в коническую колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 5,0 мл воды, 10,0 мл 0,05 М раствора натрия гидроксида и нагревают на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 20 мин. После охлаждения в колбу прибавляют

0,05 мл фенолфталеина раствора 1 % и титруют 0,05 М раствором хлористоводородной кислоты до желтого окрашивания.

Параллельно проводят контрольный опыт без нагревания.

Содержание суммы сесквитерпеновых лактонов в пересчете на арнифолин в настойке в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(10 \cdot k_1 - V_{HCl} \cdot k_2) \cdot T \cdot 100}{a},$$

где: 10 – объем 0,05 М раствора натрия гидроксида, взятого в избытке, мл;

k_1 – поправочный коэффициент 0,05 М раствор натрия гидроксида;

V_{HCl} – объем 0,05 М раствора хлористоводородной кислоты, затраченного на титрование избытка первого титрованного раствора, мл;

k_2 – поправочный коэффициент 0,05 М раствора хлористоводородной кислоты;

T – титр по сумме сесквитерпеновых лактонов (титриметрический фактор пересчета), равный 0,00906 г;

a – навеска настойки, г.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Артемизия абротанум **ФС.2.6.0007.18**

Абротанум

Artemisia abrotanum

Abrotanum

Настойка гомеопатическая матричная **Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Артемизия абротанум (Абротанум) - Artemisia abrotanum (Abrotanum) настойку гомеопатическую матричную, получаемую из свежих, собранных во время цветения неодревесневших верхушек побегов и листьев дикорастущего многолетнего растения полыни лечебной – *Artemisia abrotanum* L., семейства астровых – *Asteraceae,* и применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Для получения настойки необходимо:

Полыни лечебной неодревесневших верхушек побегов и листьев свежих - 100 г

Спирта этилового 86 % (м/м) или 90 % (о/о) - достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляется по способу 3 ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Описание

Жидкость от желтовато-зеленого до коричневато-зеленого цвета с характерным запахом.

Подлинность

1. Тонкослойная хроматография

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 10 мкл настойки и 5 мкл раствора СО рутина (см. раздел «Количественное определение», раствор А СО рутина). Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 1 ч смесью растворителей этилацетат – муравьиная кислота – вода (80:10:10) и хроматографируют восходящим способом. После прохождения фронта растворителей 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, пластинку вынимают и оставляют под тягой до удаления следов растворителей. После высушивания пластинку просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм в течение 30-40 мин.

На хроматограмме раствора СО рутина обнаруживается зона адсорбции коричневого цвета.

На хроматограмме настойки должны присутствовать зона адсорбции коричневого цвета на уровне зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО рутина, а также зоны голубовато-зеленого, светло-зеленого, голубого, коричневого, ярко голубого и красного цвета (флавоноиды, кумарины, фенолкарбоновые кислоты). Допускается присутствие дополнительных зон.

2. 3 мл настойки упаривают до 1 мл на водяной бане, разбавляют водой в соотношении 1:2 и обрабатывают последовательно в делительной воронке 3 раза петролейным эфиром (объемом по 2 мл). Водную (раствор А) и эфирную (раствор Б) фазы отделяют друг от друга.

2 мл раствора Б выпаривают досуха и остаток растворяют в 1 мл спирта 96 %. К полученному раствору добавляют несколько капель натрия гидроксида раствора 5 %. Раствор приобретает желтый цвет. Затем к раствору прибавляют несколько капель диазореактива. Раствор приобретает красно-оранжевую окраску (кумарины).

3. К 2 мл раствора А и раствора Б добавляют по 0,5 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и 0,03-0,05 г цинковой пыли. При нагревании в растворе А появляется интенсивное розовое

окрашивание (гликозиды флавоноидов), в растворе Б – красное окрашивание (агликоны флавоноидов).

Сухой остаток. Не менее 2,0 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,895 до 0,915 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в настойке должно быть не менее 1,0 %.

Приготовление растворов

Раствор СО рутина: Около 0,05 г (точная навеска) СО рутина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 85 мл спирта 96 % при нагревании на водяной бане, охлаждают, доводят объем спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор А СО рутина). Срок годности раствора 30 сут при хранении в прохладном защищенном от света месте.

1,0 мл раствора А СО рутина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 4 мл алюминия хлорида раствора 3 % в спирте 96 %, прибавляют 0,5 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б СО рутина). Срок годности раствора 30 сут при хранении в прохладном защищенном от света месте.

Около 1,0 г (точная навеска) настойки помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 4 мл алюминия хлорида раствора 3 % в спирте 96 %, 0,5 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, доводят объем раствора до метки спиртом 96 % и перемешивают (испытуемый раствор).

Через 40 мин измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, приготовленный в тех же условиях без добавления раствора алюминия хлорида.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО рутина. В качестве раствора сравнения используют раствор, приготовленный в тех же условиях без добавления раствора алюминия хлорида.

Содержание суммы флавоноидов в процентах (Х) в пересчете на рутин, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_o \cdot 1 \cdot 25 \cdot 100 \cdot P}{A_o \cdot a \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;
A_0 – оптическая плотность раствора Б СО рутина;
a – навеска настойки, г;
a_0 – навеска СО рутина г;
Р – содержание основного вещества в СО рутина, %.

Допускается содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в процентах (X) вычислять с использованием удельного показателя поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 25 \cdot 100 \cdot P}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;
$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при длине волны 410 нм, равный 260;
a – навеска настойки, г.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Артемизия абсинтиум **ФС.2.6.0008.18**
Абсинтиум

Artemisia absinthium
Absinthium

Настойка гомеопатическая матричная **Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Артемизия абсинтиум, Абсинтиум - Artemisia absinthium (Absinthium), настойку гомеопатическую матричную, получаемую из свежих, собранных во время цветения неодревесневших верхушек побегов и листьев дикорастущего многолетнего травянистого растения полыни горькой – *Artemisia absinthium* L. сем. астровых – *Asteraceae*, и применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Для получения настойки необходимо:

Полыни горькой неодревесневших верхушек побегов и листьев свежих	- 100 г
Спирта этилового 86 % (м/м) или 90 % (о/о)	- достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляется по способу 3 ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Описание

Жидкость от желтовато-коричневого до зеленовато-коричневого цвета с характерным запахом.

Подлинность

1.Тонкослойная хроматография.

Приготовление растворов

Раствор стандартного образца (СО) ментола. Около 0,1 г СО ментола растворяют в 10 мл спирта 96 % Срок годности раствора 30 суток при хранении в холодильнике.

10 мл настойки упаривают до 5 мл на роторном испарителе при 35 °С, затем экстрагируют смесью гексан – метиленхлорид (1 : 1) 3 раза по 5 мл. Органическую фазу упаривают на роторном испарителе при 30 °С досуха. Сухой остаток растворяют в 0,5 мл спирта 96 % (испытуемый раствор).

1. На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 5 мкл испытуемого раствора и 1 мкл раствора СО ментола. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 1 ч смесью растворителей толуол – уксусная кислота – ацетон (80:10:10), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат на воздухе в течение 10 мин и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться 2 зоны адсорбции коричневого цвета.

Затем хроматограмму обрабатывают смесью уксусной кислоты ледяной с серной концентрированной кислотой (50:1), нагревают при температуре 105 – 110 °С в течение 5 – 10 мин и просматривают при дневном свете в течение 10 – 12 мин.

На хроматограмме раствора СО ментола в верхней трети должна обнаруживаться зона адсорбции синего цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора от линии старта должны обнаруживаться зоны темно-красного цвета, зона желтого цвета; серо-фиолетовая зона и две зоны светло-красного цвета ниже и выше зоны на хроматограмме СО ментола; допускается обнаружение дополнительных зон адсорбции.

2. 15 мл настойки дистиллируют, к дистилляту добавляют 2 мл цинка сульфата раствора 1 % и 0,5 мл натрия нитропруссида раствора 1 %, хорошо

взбалтывают, затем прибавляют 4 мл натрия гидроксида раствора 8,5 %, через 3 – 5 мин добавляют 2 – 3 мл уксусной кислоты ледяной. Должно наблюдаться красно-оранжевое окрашивание, переходящее в красно-коричневое (абсинтин).

Сухой остаток. Не менее 1,8 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,900 до 0,920 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в настойке должно быть не менее 0,5 %.

Приготовление растворов

Раствор СО рутина: Около 0,05 г (точная навеска) СО рутина, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 85 мл спирта 96 % при нагревании на водяной бане, охлаждают, доводят объем спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор А). Срок годности раствора 30 сут при хранении в прохладном защищенном от света месте.

1,0 мл раствора А СО рутина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 4 мл алюминия хлорида раствора 3 % в спирте 96 %, прибавляют 0,5 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б СО рутина). Срок годности раствора 30 сут при хранении в прохладном защищенном от света месте.

1,0 мл настойки помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл алюминия хлорида раствора 3 % в спирте 96 %, прибавляют 0,5 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (испытуемый раствор).

Через 40 мин измеряют оптическую плотность испытуемого раствора при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, приготовленный в тех же условиях без добавления раствора алюминия хлорида.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО рутина. В качестве раствора сравнения используют раствор, приготовленный в тех же условиях без добавления раствора алюминия хлорида.

Содержание суммы флавоноидов в процентах (Х) в пересчете на рутин, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 25 \cdot 100 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;
A_0 – оптическая плотность раствора Б СО рутина;
a – объем испытуемой настойки, мл;
a_0 – навеска СО рутина, г;
P – содержание основного вещества в СО рутина, %.

Допускается содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин вычислять с использованием удельного показателя поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 25}{A_{1см}^{1\%} \cdot a \cdot}$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;
$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при длине волны 410 нм, равный 260;
a – объем испытуемой настойки, мл;

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Артемизия вульгарис **ФС.2.6.0009.18**

Artemisia vulgaris

Настойка гомеопатическая матричная **Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяются на Артемизия вульгарис - Artemisia vulgaris настойку гомеопатическую матричную, получаемую из свежих, собранных поздней осенью или в начале зимы, очищенных от земли и надземных частей корневищ и корней дикорастущего многолетнего травянистого растения полыни обыкновенной – *Artemisia vulgaris* L. сем. астровых – *Asteraceae* и применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Для получения настойки необходимо:

Полыни обыкновенной корневищ и корней свежих - 100 г

Спирта этилового 86 % (м/м) или 90 % (м/м) - достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляется по способу 3 ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Описание

Жидкость от темно-желтого до светло-коричневого цвета с характерным запахом.

Подлинность

*1. **Тонкослойная хроматография***

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 10 мкл настойки полосой длиной 10 мм. Пластинку с нанесенной пробой сушат на воздухе в течение 15 мин и помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 60 мин смесью растворителей ацетон - метиленхлорид (5 : 95) и хроматографируют восходящим способом. После прохождения фронта растворителей 80 - 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают и сушат до удаления следов растворителей. Затем пластинку помещают в камеру, насыщенную парами аммиака на 5 мин и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм в течение 30-40 мин.

На хроматограмме настойки должны обнаруживаться зоны адсорбции с флюоресценцией зелено-голубого цвета и две зоны голубого цвета (кумарины); допускается обнаружение дополнительных зон адсорбции.

2. К 1 мл настойки прибавляют несколько капель железа (III) аммония сульфата раствора 1 %. Появляется черно-зеленое окрашивание (дубильные вещества).

3. К 1 мл настойки прибавляют 1 мл медно-тартратного реактива и подогревают; через 5-7 мин выпадает кирпично-красный осадок (восстанавливающие сахара).

Сухой остаток. Не менее 1,5 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. 0,900-0,920 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание суммы фенолкарбоновых кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту в настойке должно быть не менее 0,3 %.

Около 0,5 г (точная навеска) настойки гомеопатической матричной по-

мещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 50 % до метки и перемешивают. 0,5 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора спиртом 50 % до метки и перемешивают (испытуемый раствор).

Оптическую плотность испытуемого раствора измеряют на спектрофотометре в кювете толщиной 10 мм при длине волны 330 нм. В качестве раствора сравнения используют спирт 50 %.

Содержание суммы фенолкарбоновых кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту в настойке рассчитывают в процентах (X) по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 25 \cdot 10}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 0{,}5},$$

где: A – оптическая плотность испытуемого раствора;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$– удельный показатель поглощения хлорогеновой кислоты при длине волны 330 нм, равный 531;

a – навеска настойки, г.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Атропа белла-донна **ФС.2.6.0010.18**

Белладонна (4)

Atropa bella-donna

Belladonna (4)

Настойка гомеопатическая матричная **Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяются на Атропа белла-донна (Белладонна) (4) - Atropa bella-donna (Belladonna) (4) настойку гомеопатическую матричную, получаемую из высушенных листьев красавки - *Atropa bella-donna* L., сем. пасленовых - *Solanaceae*, и применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Для получения настойки необходимо:

Красавки листьев высушенных - 100 г

Спирта этилового 62 % (м/м) или 70 % (о/о) - достаточное количество для получения настойки

Примечание.

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляется по способу 4 ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Описание. Жидкость зеленовато-коричневого цвета, своеобразного запаха.

Подлинность

Приготовление растворов

Раствор стандартного образца (СО) атропина сульфата. Около

0,1 г СО атропина сульфата, растворяют в 10 мл спирта 96 %.

1. Тонкослойная хроматография

10 мл настойки помещают в колбу вместимостью 50 мл и нагревают на кипящей водяной бане до удаления спирта. К остатку прибавляют 1 мл аммиака раствора концентрированного, перемешивают, помещают в делительную воронку, прибавляют 10 мл эфира и встряхивают в течение 20 мин. Эфирное извлечение отделяют и помещают в колбу вместимостью 50 мл. Экстракцию проводят повторно с 10 мл эфира. Объединенные эфирные извлечения фильтруют через бумажный складчатый фильтр с 1,0 г натрия сульфата безводного в круглодонную колбу вместимостью 50 мл и отгоняют с помощью роторного испарителя при нагревании на кипящей водяной бане досуха. Сухой остаток растворяют в 1,0 мл спирта 96 % (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 20 мкл испытуемого раствора и 2 мкл раствора СО атропина сульфата. Пластинку помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 20 мин смесью растворителей спирт 96 % - аммиака раствор концентрированный (97:3) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и обрабатывают реактивом Драгендорфа.

На хроматограмме раствора СО атропина сульфата должна обнаруживаться зона оранжевого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться интенсивная зона оранжевого цвета на уровне зоны на хроматограмме СО атропина сульфата, выше слабо окрашенная зона оранжевого цвета, допускается обнаружение дополнительных зон зеленовато-серого цвета.

2. К 2 мл настойки, прибавляют 0,5 мл железа(III) хлорида

раствора 3 %; должно наблюдаться образование темно-зеленого окрашивания (фенольные вещества);

3. В делительную воронку помещают 5 мл настойки, прибавляют 5 мл воды, 1 мл аммиака раствора концентрированного 25 % и 10 мл эфира. Встряхивают в течение 5 мин, эфирную фазу отделяют и фильтруют через бумажный складчатый фильтр с 1 г натрия сульфата безводного в фарфоровую чашку, выпаривают на кипящей водяной бане досуха. К сухому остатку прибавляют 0,5 мл азотной кислоты концентрированной и выпаривают досуха на кипящей водяной бане. К остатку прибавляют 5 мл ацетона и по каплям 0,2 мл калия гидроксида раствора спиртового 3 %; должно наблюдаться образование фиолетового окрашивания (алкалоиды).

Сухой остаток. Не менее 1,5 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,890 до 0,905 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание суммы алкалоидов в пересчете на гиосциамин в настойке должно быть не менее 0,020 % и не более 0,055 %.

Около 10,0 г (точная навеска) настойки помещают в делительную воронку вместимостью 250 мл, прибавляют 5 мл воды, 5 мл аммиака раствора концентрированного 25 %, 100 мл эфира и встряхивают в течение 15 мин. Нижнее (водное) извлечение отделяют, к эфирному извлечению прибавляют 25 мл воды, встряхивают в течение 3 мин, затем

водную фазу отделяют и отбрасывают. К эфирному извлечению прибавляют 20 мл хлористоводородной кислоты 1 % и встряхивают в течение 5 мин. Кислотное извлечение переносят в другую делительную воронку вместимостью 250 мл. Экстракцию хлористоводородной кислотой 1 % проводят еще три раза порциями по 20 мл, извлечения сливают в ту же делительную воронку. Кислотное извлечение подщелачивают раствором аммиака до щелочной реакции по фенолфталеину, алкалоиды извлекают три раза по 15 мл хлороформа, взбалтывая по 3 мин. Хлороформные извлечения объединяют в делительной воронке вместимостью 100 мл, промывают три раза по 10 мл воды (до нейтральной реакции промывных вод по индикаторной бумаге) и фильтруют через бумажный фильтр с 5,0 г натрия сульфата безводного, смоченного хлороформом, в круглодонную колбу вместимостью 100 мл. Хлороформ отгоняют под вакуумом при нагревании на кипящей водяной бане досуха. Сухой остаток растворяют в 5 мл спирта 70 %, прибавляют 5 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,02 М, 0,1 мл метилового красного спиртового раствора 0,1 % и 0,05 мл метиленового синего спиртового раствора. Избыток хлористоводородной кислоты оттитровывают натрия гидроксида раствором 0,02 М до появления зеленой окраски. Параллельно проводят контрольный опыт.

Содержание суммы алкалоидов в пересчете на гиосциамин в процентах (X) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{(5 - V) \cdot 0{,}005780 \cdot 100}{a},$$

где V – объем натрия гидроксида раствора 0,02 М, пошедшего на титрование, мл;
0,005780 – количество алкалоидов в пересчете на гиосциамин, соответствующее 1 мл 0,02 М раствора хлористоводородной кислоты;
a – навеска настойки, г.

Испытание четвертого десятичного разведения (D4). Измеряют

оптическую плотность четвертого десятичного разведения при длине волны 264 нм, в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют спирт 43 %. Оптическая плотность раствора не должна превышать 0,140.

Примечание

Приготовление четвертого десятичного разведения D4 производят в соответствии с ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Хранить с осторожностью.

Ахиллеа миллефолиум **ФС.2.6.0011.18**

Миллефолиум

Achillea millefolum

Millefolium

Настойка гомеопатическая матричная **Взамен ФС 42-0110-03**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Ахиллеа миллефолиум (Миллефолиум) - Achillea millefolium (Millefolium) настойку гомеопатическую матричную, получаемую из собранной во время цветения свежей травы растения тысячелистника обыкновенного – *Achillea millefolium* L. сем. астровых – *Asteraceae* и применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Для получения настойки необходимо:

Тысячелистника обыкновенного травы свежей - 100 г

Спирта этилового 86 % (м/м) или 90 % (о/о) - достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляется по способу 3 ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Описание

Прозрачная жидкость зеленовато-коричневого цвета с характерным запахом.

Подлинность

1. Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) рутина. Около 0,005 г СО рутина растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора 30 сут при хранении в прохладном защищенном от света месте.

Раствор стандартного образца (СО) ментола. Около 0,05 г СО ментола растворяют в 10 мл спирта 96 %. Срок годности раствора 10 сут при хранении в прохладном защищенном от света месте.

1. На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят раздельно полосами длиной 10 мм и шириной не более 2 мм по 10 мкл испытуемой настойки и раствора СО рутина.

Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 60 мин смесью растворителей этилацетат – уксусная кислота ледяная – вода (10:4:1), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и обрабатывают алюминия хлорида раствором 2 %, выдерживают при температуре 100-105 °С в течение 2 мин и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО рутина должна обнаруживаться зона адсорбции с флюоресценцией желтого цвета.

На хроматограмме испытуемой настойки должны обнаруживаться не менее 4 зон адсорбции с флуоресценцией желтого цвета: зона на уровне зоны СО рутина, одна зона над зоной СО рутина и две зоны под ней; допускается обнаружение других зон (флавоноиды).

2. В делительную воронку вместимостью 25 мл помещают 2 мл настойки, приливают 2 мл воды и перемешивают. Затем прибавляют 2 мл гексана и извлекают в течение 2 – 3 мин. После разделения фаз органический слой отделяют и переносят в круглодонную колбу. Остаток в делительной

воронке экстрагируют ещё пять раз, используя каждый раз по 2 мл гексана. Извлечения объединяют и отгоняют растворитель на роторном испарителе при температуре водяной бани не выше 45 °С досуха. Сухой остаток растворяют в 1 мл спирта этилового 96 % (испытуемый раствор).

На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят полосой длиной 10 мм и шириной не более 2 мм 20 мкл испытуемого раствора и рядом 1 мкл раствора СО ментола.

Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре в течение 5 мин, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 60 мин смесью растворителей этилацетат-бензол (7:3), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и обрабатывают анисового альдегида раствором уксуснокислым в метаноле, затем выдерживают при температуре 105 - 110 °С в течение 5 – 10 мин и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме СО ментола должна обнаруживаться зона адсорбции красно-фиолетового цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться не менее 7 зон: 4 зоны адсорбции от зеленовато-коричневого, розового до красновато-фиолетового цвета ниже зоны адсорбции СО ментола, зона адсорбции красновато-фиолетового цвета на уровне зоны адсорбции СО ментола, выше – 2 зоны адсорбции от красно-фиолетового до фиолетового цвета (терпеноиды); допускается обнаружение других зон адсорбции.

3. К 0,5 мл настойки прибавляют 0,1 мл железа (III) аммония сульфата раствора; должно наблюдаться образование коричнево-черного окрашивания (дубильные вещества).

Сухой остаток. Не менее 3 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,897 до 0, 919 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-глюкозид в настойке должно быть не менее 0,05 %.

10,0 г (точная навеска) настойки помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят спиртом 70 % до метки (испытуемый раствор А).

2,0 мл испытуемого раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл алюминия хлорида раствора 2 % в спирте 70 % и через 10 мин – 1 мл уксусной кислоты раствора 3 %, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки, перемешивают и оставляют на 30 мин (испытуемый раствор Б).

Оптическую плотность испытуемого раствора Б измеряют на спектрофотометре при длине волны 396 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения раствор, состоящий из 2,0 мл испытуемого раствора А, 1 мл уксусной кислоты раствора 3 %, доведенный спиртом 70 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в настойке в пересчете на лютеолин-7-О-глюкозид в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25}{A_{1\,см}^{1\%} \cdot a \cdot 2},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора Б;

$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения лютеолин-7-О-глюкозида с алюминия хлоридом в спирте 70 % при длине волны 396 нм, равный 345;

a – навеска настойки, г.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Берберис вульгарис е фруктибус **ФС.2.6.0012.18**
Берберис, фруктус

Berberis vulgaris e fructibus
Berberis, Fructus

Настойка гомеопатическая матричная **Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Берберис вульгарис е фруктибус (Берберис, фруктус) - Berberis vulgaris e fructibus (Berberis, Fructus) настойку гомеопатическую матричную, получаемую из свежих зрелых плодов барбариса обыкновенного – *Berberis vulgaris* L., сем. барбарисовых – *Berberidaceae*, применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Для получения настойки необходимо:

Барбариса плодов зрелых свежих - 100 г

Спирта этилового 62 % (м/м) или 70 % (о/о) - достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляют по способу 2а ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Описание

Прозрачная жидкость от ярко-красного до красно-коричневого цвета с фруктовым запахом.

Подлинность

1. ***Тонкослойная хроматография***

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) берберина бисульфата. Около 0,015 г СО берберина бисульфата растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора 30 сут.

Раствор СО лимонной кислоты. Около 0,11 г СО лимонной кислоты моногидрата растворяют в 10 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 90 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор СО яблочной кислоты. Около 0,10 г СО яблочной кислоты растворяют в 10 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор СО винной кислоты. Около 0,10 г СО винной кислоты растворяют в 10 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор бромкрезолового зеленого (синего) 0,4 % в спирте 96 %. 0,4 г бромкрезолового зеленого (синего) растворяют в 50 мл спирта 96 % и доводят объем раствора водой до 100 мл. Срок годности раствора не более 6 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

А. Около 10 мл настойки помещают в фарфоровую чашку и выпаривают на кипящей водяной бане до объема около 3 мл. После охлаждения до комнатной температуры добавляют 5 мл аммиака раствора концентрированного 25 % и перемешивают. Смесь помещают в делительную воронку и трижды экстрагируют этиловым эфиром порциями по 20, 10, 10 мл по 5 мин. Объединенные эфирные извлечения выпаривают с помощью роторного испарителя при температуре 50 °С досуха. Сухой остаток растворяют в 1 мл спирта этилового 96 % (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 25 мкл испытуемого раствора и 1 мкл раствора СО берберина бисульфата раздельно полосами длиной 10 мм. Хроматографируют восходящим способом в системе растворителей этилацетат - спирт этиловый 96 % - аммиака раствор 10 % (40:10:5). Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии

старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и опрыскивают реактивом Драгендорфа.

На хроматограмме раствора СО берберина бисульфата должна обнаруживаться зона адсорбции оранжевого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться не менее 6 зон адсорбции: 2 слабо выраженные зоны желто-оранжевого цвета на уровне зоны адсорбции СО берберина бисульфата (берберин) и выше; далее выше зона средней интенсивности оранжевого цвета и три очень интенсивные зоны оранжевого цвета. Допускается обнаружение других зон оранжевого цвета.

Б. На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля размером 10 × 15 см наносят в виде полос длиной 10 мм, шириной не более 3 мм по 5 мкл настойки, раствора СО лимонной кислоты, раствора СО яблочной кислоты, и раствора СО винной кислоты. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную не менее 30 мин смесью растворителей спирт этиловый 96 % - аммиака раствор 10 % (80:20) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и обрабатывают раствором бромкрезолового зеленого (синего) 0,4 % в спирте 96 %, выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100 – 105 °С в течение 2 – 3 мин.

На хроматограмме растворов СО лимонной кислоты, СО яблочной кислоты и СО винной кислоты должны обнаруживаться зоны адсорбции желтовато-белого цвета на ярко-голубом фоне.

На хроматограмме настойки должны обнаруживаться следующие зоны адсорбции желтовато-белого цвета на ярко-голубом фоне: на уровне зоны СО

лимонной кислоты, на уровне зоны СО яблочной кислоты и на уровне зоны СО винной кислоты, допускается обнаружение дополнительных зон.

2. К 1 мл настойки прибавляют 5 мл воды и 5 капель железа(III) хлорида раствора 3 %; должно наблюдаться темно-зеленое окрашивание (фенольные соединения).

3. К 1 мл настойки прибавляют 25 мл воды. К 1 мл полученного раствора прибавляют 2 капли натрия гидроксида раствора 30 %; должно наблюдаться ярко-желтое окрашивание (фенольные соединения).

4. К 5 мл настойки прибавляют 25 мл спирта этилового 96 % и нагревают на водяной бане; должно наблюдаться образование хлопьевидных сгустков (полисахариды).

Сухой остаток. Не менее 8 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,975 до 1,000 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание суммы органических кислот пересчете на яблочную кислоту в настойке должно быть не менее 2,9 %.

К 2,0 г (точная навеска) настойки прибавляют 50 мл воды и 5 капель фенолфталеина раствора 1 %. Титруют 0,1 М раствором натрия гидроксида до вишнево-красного окрашивания.

1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида соответствует 6,7 мг суммы органических кислот в пересчете на яблочную кислоту.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Берберис вульгарис **ФС.2.6.0013.18**

Берберис

Berberis vulgaris

Berberis

Настойка гомеопатическая матричная **Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Берберис вульгарис (Берберис) - Berberis vulgaris (Berberis) настойку гомеопатическую матричную, получаемую из высушенной коры надземных и подземных частей барбариса обыкновенного – *Berberis vulgaris* L., сем. барбарисовых – *Berberidaceae*, применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Для получения настойки необходимо:

Барбариса обыкновенного высушенной коры надземных и подземных частей (измельченных до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,7 мм)	- 100 г
Спирта этилового 62 % (м/м) или 70 % (о/о)	- достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляют по методу 4 ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Описание

Жидкость от темно-желтого до красновато-коричневого цвета, с терпким пряным запахом.

Подлинность

1. ***Тонкослойная хроматография***

Приготовление растворов

Раствор стандартного образца (СО) берберина бисульфата. Около 0,010 г СО берберина бисульфата растворяют в 5 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора 30 сут.

Раствор серной кислоты 0,05 М в метаноле. Осторожно при постоянном охлаждении и перемешивании 1,4 мл серной кислоты прибавляют к 60 мл метанола безводного, охлаждают и доводят объем раствора тем же растворителем до 100,0 мл. 20 мл полученного раствора доводят метанолом безводным до объема 100,0 мл.
Готовят непосредственно перед использованием.

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 20 мкл испытуемой настойки и 10 мкл раствора СО берберина бисульфата раздельно полосами длиной 10 мм. Хроматографируют восходящим способом в системе растворителей спирт *н*-бутиловый – уксусная кислота ледяная - вода (40:10:10). Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и просматривают при дневном свете и УФ-свете при длине волны 365 нм.

При дневном свете на хроматограмме раствора СО берберина бисульфата должна обнаруживаться зона адсорбции желтого цвета. На хроматограмме испытуемой настойки должны обнаруживаться 2 зоны адсорбции желтого цвета ниже и на уровне зоны адсорбции на хроматограмме СО берберина бисульфата (берберин).

В УФ-свете при длине волны 365 нм на хроматограмме раствора СО берберина бисульфата должна обнаруживаться зона адсорбции желтого цвета. На хроматограмме испытуемой настойки должны обнаруживаться (по

возрастанию от линии старта): 1-2 зоны голубого цвета, 2 зоны желтого цвета ниже и на уровне зоны адсорбции СО берберина бисульфата (берберин) и серовато-розового цвета.

Затем пластинку обрабатывают модифицированным реактивом Драгендорфа.

При дневном свете на хроматограмме раствора СО берберина бисульфата должна обнаруживаться зона адсорбции оранжевого цвета.

На хроматограмме испытуемой настойки должны обнаруживаться 2 зоны оранжевого цвета ниже зоны адсорбции на хроматограмме СО берберина бисульфата и одна зона на уровне берберина бисульфата (берберин).

2. К 1 мл настойки прибавляют 1 мл калия йодида раствора 10 %; должен выпадать осадок желтого цвета (алкалоиды).

Плотность. От 0,890 до 0,910 (ОФС «Плотность»).

Сухой остаток. Не менее 1,2 % (ОФС «Настойки»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание суммы алкалоидов в пересчете на берберин в настойке должно быть не менее 0,18 и не более 0,60 %

2,00 г испытуемой настойки помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и разбавляют 0,05 М раствором кислоты серной в метаноле (испытуемый раствор).

Оптическую плотность испытуемого раствора измеряют сразу после разбавления настойки на спектрофотометре при длине волны 425 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения. В качестве раствора сравнения используют 0,05 М раствор кислоты серной в метаноле.

Содержание алкалоидов в пересчете на берберин в вычисляют по формуле:

Содержание суммы алкалоидов в настойке в пересчете на берберин процентах (*X*), вычисляют с использованием удельного показателя поглощения берберина $A^{1\%}_{1см}$ по формуле:

$$X = \frac{A \times 100}{A^{1\%}_{1см} \times a}$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора при 425 нм;

a – навеска настойки, г;

$A^{1\%}_{1см}$ – удельный показатель поглощения берберина при длине волны 425 нм, равный 163.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Хранить с осторожностью.

Бриония **ФС.2.6.0014.18**

Bryonia

Настойка гомеопатическая матричная **Взамен ФС 42-0158-05**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Бриония - Bryonia, настойку гомеопатическую матричную, получаемую из свежих, собранных перед цветением корней брионии двудомной – *Bryonia cretica* ssp. dioica (Jacq.) Tutin или брионии белой – *Bryonia alba* L., сем. тыквенных – *Cucurbitaceae,* и применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Для получения настойки необходимо:

Брионии корней свежих (при содержании влаги не менее 70 %) - 100 г

Спирта этилового 86 % (м/м) или 90 % (о/о) - достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляется по методу 2 ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Описание

Прозрачная жидкость от светло-желтого до темно-желтого цвета без характерного запаха.

Подлинность

Приготовление растворов

Ванилина раствор в фосфорной кислоте. 0,50 г ванилина растворяют в смеси, состоящей из 15,0 мл кислоты ортофосфорной концентрированной и 85,0 мл спирта 96 %, осторожно перемешивают. Срок годности 2 сут.

Раствор стандартного образца (СО) фенолфталеина. 0,1 г СО фенолфталеина растворяют в 10 м спирта 96 %. Раствор используют свежеприготовленным.

1.Тонкослойная хроматография.

В делительную воронку вместимостью 50 мл помещают 10,0 мл настойки, прибавляют 20,0 мл хлороформа, встряхивают в течение 3 мин и оставляют до разделения фаз. Нижнюю фазу сливают в круглодонную колбу вместимостью 50 мл. Хлороформное извлечение выпаривают с помощью роторного испарителя при нагревании на кипящей водяной бане досуха. Сухой остаток растворяют в 1,0 мл этилового спирта 96 % (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят полосой длиной 10 мм и шириной не более 2 мм 15 мкл испытуемого раствора и 0,5 мкл раствора СО фенолфталеина. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в хроматографическую камеру, предварительно насыщенную в течение 10 мин смесью растворителей: хлороформ – ацетон (6:1), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, хроматограмму вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, опрыскивают ванилина раствором в фосфорной кислоте, выдерживают при температуре 100 °С в течение 5 - 8 мин и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО фенолфталеина в нижней трети должна обнаруживаться зона адсорбции розового цвета, обесцвечивающаяся в течение нескольких минут.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться: на линии старта зона адсорбции серо-коричневого или желто-коричневого цвета, зона адсорбции желтого цвета ниже уровня зоны адсорбции СО

фенолфталеина, выше несколько зон фиолетового и розово-фиолетового цвета на уровне или немного ниже зоны адсорбции СО фенолфталеина, три и более зон от фиолетового до ярко-фиолетового цвета выше уровня зоны адсорбции СО фенолфталеина и ещё выше зона красновато-фиолетового цвета; допускается обнаружение других зон адсорбции желтого или светло-фиолетового цвета.

2. К 2 мл настойки прибавляют 0,2 мл железа (III) хлорида раствора 1 %; должно наблюдаться образование коричневого окрашивания с помутнением. К полученной смеси осторожно по стенке пробирки прибавляют 1 мл серной кислоты концентрированной; на границе раздела фаз должно наблюдаться образование сине-зеленого окрашивания (гликозиды).

3. К 2 мл настойки, прибавляют 0,5 мл натрия гидроксида раствора 10 % и 0,1 мл пикриновой кислоты насыщенного раствора, нагревают в течение 3 мин на кипящей водяной бане; должно наблюдаться окрашивание красного цвета (гликозиды).

Сухой остаток. Не менее 1,7 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,940 до 0,965 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Суммы кукурбитацинов в пересчете на кукурбитацин Е ($C_{32}H_{44}O_8$; М.м. 556,7) в настойке должно быть не менее 0,001 % и не более 0,020 %

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) кукурбитацина Е. Около 2,0 мг (точная навеска) СО кукурбитацина Е помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, прибавляют 4 мл метанола, перемешивают до полного растворения, доводят объем раствора метанолом до метки, перемешивают.

Срок годности растворов не более 30 сут при хранении в плотно укупоренной таре в прохладном, защищенном от света месте.

Проверка пригодности хроматографической системы.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- относительное стандартное отклонение площади пика кукурбитацина Е должно быть не более 2,0 %;
- фактор асимметрии пика кукурбитацина Е должен быть не более 2,0;
- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику кукурбитацина Е, должна быть не менее 5000 теоретических тарелок.

Около 5,0 г (точная навеска) настойки фильтруют через нейлоновый фильтр (с размером пор 0,45 мкм) в мерную колбу, вместимостью 5 мл и доводят спиртом 90 % до метки (испытуемый раствор).

Условия хроматографирования

Колонка — 150 × 4,6 мм, октадецилсилилсиликагель (C_{18}) для хроматографии, 3 – 10 мкм;

Подвижная фаза — А - вода для хроматографии; Б - ацетонитрил для хроматографии;

Способ элюирования — программа градиента

Время (мин)	**А, об. %**	**В, об. %**
0 – 2	80	20
2 – 22	80 → 40	20 → 60
22 – 23	40 → 80	60 → 20
23 – 28	80	20

Скорость потока, мл/мин — 1,5

Температура колонки, °С — 35

Детектор — УФ-спектрофотометрический

Длина волны, нм — 270

Объем вводимой пробы, мкл	10
Время хроматографирования, мин	40

Хроматографируют попеременно испытуемый раствор и раствор СО кукурбитацина Е, получая не менее 3 хроматограмм. Результаты считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Время удерживания пиков веществ относительно кукурбитацина Е (время удерживания кукурбитацина Е около 15 мин) составляет:

кукурбитацин D/1,2,23,24 – тетрагидрокукурбитанцин I – около 0,59;
кукурбитацин I/L – около 0,70;
кукурбитацин B – около 0,89;
23,24-дигидрокукурбитацин B – около 0,92;
23,24-дигидрокукурбитацин E – около 1,04.

Время регистрации хроматограммы должно не менее чем в 2 раза превышать время удерживания пика кукурбитацина Е.

Содержание суммы кукурбитацинов в настойке гомеопатической матричной в пересчете на кукурбитацин Е в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot 5 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot a \cdot 10 \cdot 100} = \frac{S \cdot a_0 \cdot P}{S_0 \cdot a \cdot 2}$$

S – сумма площадей пиков кукурбитацинов на хроматограмме испытуемого раствора;

S_0 –площадь пика кукурбитацина Е на хроматограмме раствора СО кукурбитанцина Е;

a – навеска настойки, г;

a_0 – навеска стандарта, г;

P –содержание кукурбитанцина Е в стандартном образце, %.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Хранить с осторожностью.

Ваччиниум миртиллус **Миртиллус** **Vaccinium myrtillus** **Myrtillus** **Настойка гомеопатическая матричная**	**ФС.2.6.0015.18** **Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Ваччиниум миртиллус (Миртиллус) - Vaccinium myrtillus (Myrtillus) настойку гомеопатическую матричную, получаемую из собранных во время цветения, свежих побегов черники обыкновенной – *Vaccinium myrtillus* L. сем. вересковых – *Ericaceae,* применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Для получения настойки необходимо:

Черники обыкновенной побеги свежие	- 100 г
Спирта этилового 86 % (м/м) или 90 % (о/о)	- достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляют по способу 3 ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Описание

Прозрачная жидкость темно-коричневого цвета, с характерным запахом.

Подлинность

1. ***Тонкослойная хроматография***

Приготовление растворов.

Приготовление нингидрина раствора 1 % в ацетоне. 0,1 г нингидрина растворяют в 100 мл ацетона. Срок годности раствора 60 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

А. На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 10 мкл испытуемого раствора (см. «Количественное определение», раздел «Флавоноиды»). Пластинку с нанесенной пробой помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин смесью растворителей бутанол – уксусная кислота ледяная – вода (4:1:5), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат на воздухе в течение 5 мин, затем пластинку обрабатывают алюминия хлорида раствором 10 % в спирте 96 % и рассматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться не менее 3 зон адсорбции желтого или желто-коричневого цвета (флавоноиды).

Б. На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 10 мкл испытуемого раствора. Пластинку с нанесенной пробой помещают в хроматографическую камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин смесью растворителей бутанол – уксусная кислота ледяная – вода (4:1:5) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат на воздухе в течение 5 мин, затем пластинку обрабатывают нингидрина раствором 1 % в ацетоне и выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100 – 105 ºС в течение 5 мин.

На хроматограмме должно обнаруживаться не менее 4 зон адсорбции фиолетового или розового цвета (аминокислоты).

2. К 3-5 мл испытуемого раствора (см. «количественное определение» раздел «Дубильные вещества») добавляют 3-5 капли реактива Фолина-

Дениса и небольшое количество натрия карбоната; должно наблюдаться фиолетово-синее окрашивание (дубильные вещества).

Сухой остаток. Не менее 10,0 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,989 до 0,992 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение

Дубильные вещества

Содержание дубильных веществ в пересчете на танин в настойке должно быть не менее 3,5 %.

Проводят определение дубильных веществ в пересчете на танин. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1, навеска настойки 20,0 г).

Флавоноиды

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на кверцетин в настойке должен быть не менее 1 %.

Около 30,0 г (точная навеска) настойки помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 1,5 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, содержимое колбы встряхивают. Колбу присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на кипящей водяной бане в течение 60 мин. После этого колбу охлаждают до комнатной температуры, фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем раствора спиртом 90 % до метки и перемешивают (раствор А).

2,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл алюминия хлорида спиртового раствора 1 %, объем раствора доводят спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б).

Параллельно готовят раствор сравнения: в мерную колбу вместимостью 100 мл прибавляют 30 мл спирта 90 %, подкисленного 1,5 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и 2 мл алюминия хлорида раствора 1 %, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки, перемешивают. Раствор сравнения используют свежеприготовленным.

Через 30 мин измеряют оптическую плотность раствора Б на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на кверцетин в процентах (X) в пересчете вычисляют по формуле:

$$X \frac{A \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 2}$$

где A – оптическая плотность раствора Б;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса кверцетина с алюминия хлоридом при длине волны 410 нм равный 764,5;

a – навеска настойки, г.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Вербаскум денсифлорум **ФС.2.6.0016.18**

Вербаскум (4)

Verbascum densiflorum

Verbascum (4)

Настойка гомеопатическая матричная **Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Вербаскум денсифлорум (Вербаскум) (4) - Verbascum densiflorum (Verbascum) (4) настойку гомеопатическую матричную, получаемую из собранной во время цветения высушенной травы коровяка густоцветкового – *Verbascum densiflorum* Bertol., сем. норичниковых – *Scrophulariaceae,* применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Для получения настойки необходимо:

Коровяка густоцветкового травы высушенной - 100 г

Спирта этилового 62 % (м/м) или 70 % (о/о) - достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляется из измельченного сырья (2 мм) по способу 4 ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Описание

Прозрачная жидкость красновато-коричневого цвета без особого запаха.

Подлинность

1. Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Приготовление раствора стандартного образца (СО) нарингенина.

Около 0,01 г нарингенина растворяют в 25 мл спирта 70 % и перемешивают. Срок годности раствора 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят раздельно 10 мкл настойки и 4 мкл раствора СО нарингенина в виде точки.

Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 30 мин смесью растворителей этилацетат – уксусная кислота ледяная – вода (5:1:1), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат на воздухе при комнатной температуре для удаления следов растворителей и обрабатывают алюминия хлорида раствором 3 % в спирте 70 %, затем выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100 – 105 °С в течение 5 мин и рассматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО нарингенина должна обнаруживаться зона адсорбции желто-коричневого цвета.

На хроматограмме испытуемой настойки должны обнаруживаться (по возрастанию) 4 зоны адсорбции желто-коричневого или коричневого цвета, одна из них на уровне зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО нарингенина; голубоватого цвета; желто-зеленого цвета; две красно-оранжевого цвета; допускается обнаружение других слабо окрашенных зон желтого, голубого или коричневого цвета.

2. К 5 мл настойки, прибавляют 1 мл раствора железа(III) хлорида раствора; должно наблюдаться темно-зеленое окрашивание (вещества фенольной природы).

3. К 5 мл настойки, прибавляют 3 мл воды и тщательно взбалтывают; появляется обильная пена, стойкая в течение 30 мин (сапонины).

Сухой остаток. Не менее 1,5 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,890 до 0,910 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на нарингенин в настойке должно быть не менее 0,5 %.

Около 5,0 г (точная навеска) настойки помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивают (испытуемый раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 1,0 мл испытуемого раствора А, 3 мл алюминия хлорида раствора 3 % в спирте 70 % и 1 каплю уксусной кислоты 3 %, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивают (испытуемый раствор Б).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 1,0 мл испытуемого раствора А и 1 каплю уксусной кислоты 3 %, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивают (раствор сравнения).

Через 40 мин измеряют оптическую плотность испытуемого раствора Б при длине волны 377 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на нарингенин в настойке в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 25 \cdot 25}{A_{1\,\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 1},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора Б;

$A_{1\,\text{см}}^{1\%}$ – показатель удельного поглощения комплекса нарингенина с алюминия хлоридом при длине волны 377 нм, равный 70;

а – навеска настойки, г.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Гиосциамус нигер **ФС.2.6.0017.18**

Hyoscyamus niger

Настойка гомеопатическая матричная **Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Гиосциамус нигер - Hyoscyamus niger настойку гомеопатическую матричную, получаемую из целого свежесобранного во время цветения двулетнего растения белены черной *Hyoscyamus niger* L.*,* сем. пасленовых - *Solanaceae,* применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Для получения настойки необходимо:

Белены черной целого растения свежего	- 100 г
Спирта этилового 86 % (м/м) или 90 % (о/о)	– достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляется по способу 2 ОФС «Настойки гомеопатические матричные»

Описание

Прозрачная жидкость коричневого цвета с характерным своеобразным запахом.

Подлинность

1. Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов

Раствор стандартного образца (СО) атропина сульфата. 0,01 г СО атропина сульфата растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор СО скополамина гидробромида. 0,01 г СО скополамина гидробромида растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор СО рутина. 0,005 г СО рутина растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

А. 10 мл настойки помещают в колбу вместимостью 50 мл и нагревают на кипящей водяной бане до удаления спирта. К остатку прибавляют 1 мл аммиака раствора концентрированного 25 %, перемешивают, затем прибавляют 10 мл эфира и перемешивают в течение 20 мин. Содержимое колбы переносят в делительную воронку и после разделения фаз отделяют эфирные извлечения. Экстракцию проводят повторно в тех же условиях, используя 10 мл эфира. Объединенные эфирные извлечения фильтруют через бумажный складчатый фильтр с 2,0 г натрия сульфата безводного в круглодонную или остроконечную колбу вместимостью 50 мл. Объединенные эфирные извлечения отгоняют с помощью роторного испарителя при температуре водяной бани около 40 ºС досуха. Сухой остаток растворяют в 0,5 мл спирта 96 % (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят по 25 мкл испытуемого раствора, раствора СО атропина сульфата и раствора СО скополамина гидробромида. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную смесью ацетон – вода – аммиака концентрированный раствор (90:7:3) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее

вынимают из камеры, сушат на воздухе до удаления следов растворителей, обрабатывают реактивом Драгендорфа и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО атропина сульфата в нижней трети пластинки должна обнаруживаться зона адсорбции красно-оранжевого цвета на желтом фоне. На хроматограмме СО скополамина гидробромида в средней трети пластинки должна обнаруживаться зона адсорбции красно-оранжевого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться зоны адсорбции красно-оранжевого цвета на желтом фоне на уровне зон на хроматограмме растворов СО атропина сульфата и СО скополамина гидробромида.

Б. На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят по 20 мкл испытуемого раствора и раствора СО рутина. Пластинку с нанесенными пробами помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 40 мин смесью растворителей бутанол – уксусная кислота ледяная – вода (40:10:10) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают, сушат на воздухе до удаления следов растворителей и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО рутина должна обнаруживаться зона коричневого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться зоны адсорбции (по возрастанию): коричневого цвета на уровне зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО рутина, голубого цвета, красного цвета.

Затем хроматограммы обрабатывают алюминия хлорида раствором 1 % и выдерживают при температуре 100 – 105 ºС в течение 2 мин.

На хроматограмме раствора СО рутина должна обнаруживаться зона рутина на уровне зоны на хроматограмме раствора СО рутина до обработки реактивом.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона на уровне зоны на хроматограмме раствора СО рутина; допускается обнаружение других зон адсорбции.

2. К 2 мл настойки прибавляют 0,5 мл железа(III) хлорида раствора 3 %, должно наблюдаться черно–зеленое окрашивание (дубильные вещества).

3. 10 мл настойки помещают в делительную воронку, прибавляют 10 мл воды, 1 мл аммиака раствора концентрированного 25 %, 20 мл эфира и встряхивают в течение 5 мин. После разделения фаз эфирный слой отделяют и фильтруют через бумажный фильтр с 2 г натрия сульфата безводного в фарфоровую чашку. Экстракцию повторяют еще раз с таким же количеством эфира, фильтруя эфирный слой через тот же фильтр в ту же чашку. Объединенные эфирные извлечения выпаривают на кипящей водяной бане досуха. К сухому остатку прибавляют 0,5 мл азотной кислоты концентрированной и выпаривают на кипящей водяной бане досуха. К сухому остатку прибавляют 10 мл ацетона и по каплям калия гидроксида раствор спиртовой 3 %; должно наблюдаться фиолетовое окрашивание (алкалоиды).

Сухой остаток. Не менее 1,0 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,930 до 0,950 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание суммы алкалоидов в пересчете на гиосциамин в настойке должно быть не менее 0,004 и не более 0,010 %.

Приготовление растворов

Раствор стандартного образца (СО) атропина сульфата. Около 0,1 г (точная навеска) СО атропина сульфата количественно переносят 10 мл воды в делительную воронку, прибавляют 0,5 мл аммиака концентрированного раствора 25 % и извлекают последовательно 20, 15, 15 мл хлороформа при взбалтывании в течение 3 мин. Хлороформное извлечение фильтруют через фильтр с 2,0 г натрия сульфата безводного, смоченного хлороформом, в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем хлороформом до метки и перемешивают (раствор А СО атропина сульфата). Срок годности раствора 6 мес.

10 мл раствора А СО атропина сульфата переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора хлороформом до метки и перемешивают (раствор Б СО атропина сульфата). 1 мл раствора Б СО атропина сульфата содержит 0,0001 г атропина основания. Срок годности раствора 30 сут.

0,5 мл раствора Б СО атропина сульфата помешают в делительную воронку вместимостью 100 мл, прибавляют 20 мл воды, 10 мл ацетатного буферного раствора pH 4,5; 1 мл пикриновой кислоты раствора 1 %. Затем в воронку прибавляют 20 мл хлороформа, 1 мл пикриновой кислоты раствора 1 % и встряхивают в течение 3 мин. После разделения слоев хлороформное извлечение отделяют и фильтруют через бумажный фильтр, содержащий 2,0 г натрия сульфата безводного в мерную колбу вместимостью 25 мл. Извлечение повторяют еще раз, используя 5 мл хлороформа. Хлороформный слой отделяют и фильтруют в ту же колбу через тот же фильтр. Объединенные хлороформные извлечения в мерной колбе доводят хлороформом до метки и перемешивают.

Около 1,0 г (точная навеска) настойки помещают в фарфоровую чашку и выпаривают на кипящей водяной бане досуха. К сухому остатку прибавляют 20 мл воды, 10 мл ацетатного буферного раствора pH 4,5; перемешивают и фильтруют в делительную воронку вместимостью 100 мл. Затем в воронку прибавляют 20 мл хлороформа, 1 мл пикриновой кислоты раствора 1 % и

встряхивают в течение 3 мин. После разделения слоев хлороформное извлечение отделяют и фильтруют через бумажный фильтр, содержащий 2,0 г натрия сульфата безводного в мерную колбу вместимостью 25 мл. Извлечение повторяют еще раз, используя 5 мл хлороформа. Хлороформный слой отделяют и фильтруют в ту же колбу через тот же фильтр. Объединенные хлороформные извлечения в мерной колбе доводят хлороформом до метки и перемешивают (раствор А испытуемого раствора).

Измеряют оптическую плотность раствора А испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 402 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют хлороформ.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора В СО атропина сульфата.

Содержание суммы алкалоидов в пересчете на гиосциамин в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 25 \cdot 10 \cdot 0{,}5 \cdot \mathrm{P} \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 100 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 1{,}169 \cdot 100} = \frac{A \cdot a_0 \cdot 0{,}5 \cdot \mathrm{P}}{A_0 \cdot a \cdot 1000 \cdot 1{,}169},$$

где A – оптическая плотность раствора А испытуемого раствора;
A_0 – оптическая плотность раствора В СО атропина сульфата;
a – навеска настойки, г;
a_0 – навеска СО атропина сульфата, г;
P – содержание основного вещества в СО атропина сульфата, %;
1,169 – коэффициент пересчета на гиосциамин.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Хранить с осторожностью.

Гиперикум перфоратум **ФС.2.6.0018.18**
Гиперикум (4)

Hypericum perforatum
Hypericum (4)

Настойка гомеопатическая матричная **Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Гиперикум перфоратум (Гиперикум) (4) - Hypericum perforatum (Hypericum) (4) настойку гомеопатическую матричную, получаемую из собранной во время цветения и высушенной травы растения зверобоя продырявленного – *Hypericum perforatum* L., сем. зверобойных – *Hypericaceae,* применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Для получения настойки необходимо:

Зверобоя продырявленного травы высушенной - 100 г

Спирта этилового 62 % (м/м) или 70 % (о/о) - достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляется по способу 4 ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Описание

Жидкость от темно-красного до коричневато-красного цвета, характерного ароматного запаха.

Подлинность

1. Тонкослойная хроматография

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 10 мкл настойки и 5 мкл раствора стандартного образца гиперозида (см. «Количественное определение»). Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе в течение 10 мин и помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 40 мин смесью растворителей бутанол – уксусная кислота ледяная – вода (4:1:1) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают, сушат при комнатной температуре до удаления следов растворителей и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО гиперозида в средней трети пластинки должна обнаруживаться зона адсорбции коричнево-зеленого цвета.

На хроматограмме настойки должны обнаруживаться зоны адсорбции (по возрастанию): серого цвета, коричневато-зеленого цвета, серого цвета, зелено-коричневого цвета, серого цвета, на уровне зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО гиперозида зелено-коричневого цвета, зеленовато-коричневого цвета, голубовато-серого цвета, серого или коричневатого цвета, красного цвета; допускается обнаружение других зон коричневато-зеленого или серого цвета.

Пластинку обрабатывают алюминия хлорида раствором 3 % в спирте 70 % и рассматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО гиперозида должна обнаруживаться зона ярко-желтого цвета.

На хроматограмме настойки должны обнаруживаться зоны адсорбции ярко-желтого цвета на уровне зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО гиперозида; выше зона желто-коричневого или желтоватого цвета; допускается обнаружение других зон адсорбции.

2. К 0,5 мл настойки прибавляют 1,5 мл спирта 70 %, 0,1 г порошка магния, 1 мл хлористоводородной кислоты концентрированной; смесь должна постепенно окраситься в розовый или коричнево-розовый цвет (флавоноиды).

Сухой остаток. Не менее 1 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,885 до 0,910 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид в настойке должно быть не менее 0,1 %.

Приготовление растворов.

Раствора стандартного образца (СО) гиперозида. 0,05 г (точная навеска) СО гиперозида, предварительно высушенного при температуре 100 - 105 °С в течение 1,5 ч, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 20 мл спирта 70 %, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки, перемешивают (раствор А СО гиперозида). Срок годности раствора 30 сут.

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 2,0 мл раствор А СО гиперозида, прибавляют 3 мл алюминия хлорида раствора 3 % в спирте 70 %, 1 каплю уксусной кислоты 3 % (раствор Б СО гиперозида).

Около 2,5 г (точная навеска) настойки помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивают (раствор А испытуемого раствора).

В две мерные колбы вместимостью по 25 мл помещают по 2,0 мл раствора А испытуемого раствора; в первую колбу прибавляют 3 мл алюминия хлорида раствора 3 % в спирте 70 %, 1 каплю уксусной

кислоты 3 % (раствор Б испытуемого раствора), а во вторую 1 каплю уксусной кислоты 3 %, доводят объем растворов в обеих колбах спиртом 70 % до метки и перемешивают.

Через 40 мин измеряют оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор из второй колбы.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО гиперозида.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид в настойке в процентах *(X)* вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 2 \cdot 25 \cdot 25 \cdot 100 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot 100 \cdot 25 \cdot 2 \cdot 100}$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность раствора Б СО гиперозида;

a_0 – навеска СО гиперозида, г;

a – навеска настойки, г.

P – содержание основного вещества в СО гиперозида, %.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Гиперикум перфоратум **ФС.2.6.0019.18**
Гиперикум

Hypericum perforatum
Hypericum

Настойка гомеопатическая матричная **Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Гиперикум перфоратум (Гиперикум) - Hypericum perforatum (Hypericum) настойку гомеопатическую матричную, получаемую из собранной во время цветения свежей травы растения зверобоя продырявленного – *Hypericum perforatum* L. сем. зверобойных – *Hypericaceae*, и применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Для получения настойки необходимо:

Зверобоя продырявленного травы свежей	- 100 г
Спирта этилового 86 % (м/м) или 90 % (о/о)	- достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляется по способу 3 ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Описание. Жидкость от темно-красного до коричневато-красного цвета, своеобразного ароматного запаха.

Подлинность

1. Тонкослойная хроматография

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором наносят 10 мкл настойки в виде полосы длиной 10 мм и 5 мкл раствора СО гиперозида в виде точки (см. «Количественное определение»). Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе в течение 10 мин, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 40 мин смесью растворителей бутанол - уксусная кислота ледяная - вода (4:1:1) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают, сушат при комнатной температуре до удаления следов растворителей и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО гиперозида должна обнаруживаться зона адсорбции коричнево-зеленого цвета.

На хроматограмме настойки должны обнаруживаться зоны адсорбции (по возрастанию): серого цвета, коричневато-зеленого цвета, серого цвета на уровне зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО гиперозида, зелено-коричневого цвета, серого цвета, зелено-коричневого, зеленовато-коричневого цвета, голубовато-серого цвета, серого или коричневатого цвета, красного цвета; допускается обнаружение других зон коричневато-зеленого или серого цвета.

Пластинку обрабатывают алюминия хлорида спиртовым раствором 3 % и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО гиперозида должна обнаруживаться зона ярко-желтого.

На хроматограмме испытуемой настойки должны обнаруживаться зоны адсорбции: одна зона ярко-желтого цвета на уровне зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО гиперозида, 2 зоны ярко-желтого выше зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО гиперозида, зона желто-коричневого или желтоватого цвета; допускается обнаружение других зон

адсорбции.

2. К 0,5 мл настойки прибавляют 1,5 мл спирта 70 %, 0,1 г порошка магния, 1 мл хлористоводородной кислоты концентрированной; смесь должна постепенно окраситься в розовый или коричнево-розовый цвет (флавоноиды).

Сухой остаток. Не менее 1,5 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,895 до 0,920 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид в настойке должно быть не менее 0,2 %.

Приготовление растворов.

Приготовление раствора стандартного образца (СО) гиперозида. Около 0,05 г (точная навеска) СО гиперозида, предварительно высушенного при температуре 100 - 105 °С в течение 1,5 ч, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 20 мл спирта 70 %, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки, перемешивают (раствор А СО гиперозид). Срок годности раствора 30 сут.

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 2,0 мл раствора А СО гиперозида, прибавляют 3 мл алюминия хлорида раствора 3 % в спирте 70 %, 1 каплю уксусной кислоты 3 % (раствор Б испытуемого раствора).

Около 2,5 г (точная навеска) настойки помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивают (раствор А испытуемого раствора). В две мерные колбы вместимостью по 25 мл помещают по 2,0 мл раствора А испытуемого раствора; в первую колбу прибавляют 3 мл алюминия хлорида раствора

3 % в спирте 70 %, 1 каплю уксусной кислоты 3 % (раствор Б испытуемого раствора), а во вторую 1 каплю уксусной кислоты 3 %, доводят объем растворов в обеих колбах спиртом 70 % до метки и перемешивают.

Через 40 мин измеряют оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора с помощью спектрофотометра при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор из второй колбы.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО гиперозида.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид в настойке в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 2 \cdot 25 \cdot 25 \cdot 100 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot 100 \cdot 25 \cdot 2 \cdot 100},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
A_0 – оптическая плотность раствора Б СО гиперазида;
a_0 – навеска СО гиперозида, г;
a – навеска настойки, г.
P – содержание основного вещества в СО гиперозида, %.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Датура страмониум **ФС.2.6.0020.18**
Страмониум

Datura stramonium
Stramonium

Настойка гомеопатическая матричная **Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Датура страмониум (Страмониум) - Datura stramonium (Stramonium) настойку гомеопатическую матричную, получаемую из свежей травы, собранной во время цветения однолетнего растения дурмана обыкновенного *Datura stramonium* L., сем. пасленовых - *Solanaceae*, применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Для получения настойки необходимо:

Дурмана обыкновенного травы свежей - 100 г

Спирта этилового 86 % (м/м) или 90 % (о/о) - достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляют по способу 2, описанному в ОФС « Настойки гомеопатические матричные».

Описание

Прозрачная жидкость от зеленовато-желтого до коричневого цвета с характерным неприятным запахом.

Подлинность

1. Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) атропина сульфата. 0,01 г СО атропина сульфата растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор СО скополамина гидробромида. 0,01 г СО скополамина гидробромида растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

10,0 мл настойки помещают в колбу вместимостью 50 мл и нагревают на кипящей водяной бане до удаления спирта. К остатку прибавляют 1 мл аммиака раствора, перемешивают, затем прибавляют 10 мл эфира и встряхивают на механическом встряхивателе в течение 20 мин. Содержимое колбы переносят в делительную воронку и после разделения фаз отделяют эфирные извлечения. Экстракцию проводят повторно в тех же условиях, используя 10 мл эфира. Объединенные эфирные извлечения фильтруют через бумажный фильтр с 2,0 г натрия сульфата безводного в круглодонную или остроконечную колбу вместимостью 50 мл. Объединенные эфирные извлечения отгоняют с помощью роторного испарителя при температуре водяной бани около 40 ºС досуха. Сухой остаток растворяют в 0,5 мл спирта 96 % (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят по 25 мкл испытуемого раствора и растворов СО атропина сульфата и СО скополамина гидробромида. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную смесью растворителей ацетон – вода – аммиака раствор концентрированный 25 % (90:7:3) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, обрабатывают реактивом Драгендорфа и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО атропина сульфата должна обнаруживаться зона красно-оранжевого цвета на желтом фоне в нижней трети пластики.

На хроматограмме раствора СО скополамина гидробромида должна обнаруживаться зона красно-оранжевого цвета на желтом фоне в средней трети пластинки.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться зоны красно-оранжевого цвета на желтом фоне на уровне зон на хроматограммах растворов СО атропина сульфата и скополамина гидробромида; допускается обнаружение дополнительных зон адсорбции.

2. К 2 мл настойки прибавляют 0,5 мл железа(III) хлорида раствора 3 %, должно наблюдаться черно–зеленое окрашивание (дубильные вещества).

3. 10 мл настойки помещают в делительную воронку, прибавляют 10 мл воды, 1 мл аммиака раствора концентрированного 25 %, 20 мл эфира и встряхивают в течение 5 мин. После разделения фаз эфирный слой отделяют и фильтруют через бумажный фильтр с 2,0 г натрия сульфата безводного в фарфоровую чашку. Экстракцию повторяют еще раз с таким же количеством эфира, фильтруя эфирный слой через тот же фильтр в ту же чашку. Объединенные эфирные извлечения выпаривают на кипящей водяной бане досуха. К сухому остатку прибавляют 0,5 мл азотной кислоты концентрированной и выпаривают на кипящей водяной бане досуха. К сухому остатку прибавляют 10 мл ацетона и по каплям 0,2 мл калия гидроксида раствора спиртового 3 %; образуется фиолетовое окрашивание (алкалоиды).

Сухой остаток. Не менее 1,2 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,930 до 0,950 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание суммы алкалоидов в пересчете на гиосциамин в настойке должно быть не менее 0,015 и не более 0,040 %.

Приготовление раствора стандартного образца (СО) атропина сульфата: около 0,1 г (точная навеска) СО атропина сульфата количественно переносят с 10 мл воды в делительную воронку, прибавляют 0,5 мл аммиака раствора концентрированного 25 % и извлекают последовательно 20, 15, 15 мл хлороформа при взбалтывании в течение 3 мин. Хлороформные извлечения фильтруют через фильтр с 2,0 г натрия сульфата безводного, смоченного хлороформом, в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора хлороформом до метки и перемешивают (раствор А СО атропина сульфата). Срок годности раствора 6 мес.

10,0 мл раствор А СО атропина сульфата переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора до метки хлороформом и перемешивают (раствор Б СО атропина сульфата). Срок годности раствора 30 сут.

0,5 мл раствора Б СО атропина сульфата помещают в делительную воронку вместимостью 100 мл, прибавляют 20 мл воды, 10 мл ацетатного буферного раствора pH 4,5; 1 мл пикриновой кислоты раствора 1 %, 20 мл хлороформа и встряхивают в течение 3 мин. После разделения слоев хлороформное извлечение отделяют и фильтруют через бумажный фильтр, содержащий 2 г натрия сульфата безводного в мерную колбу вместимостью 25 мл. Извлечение повторяют еще раз, используя 5 мл хлороформа. Хлороформный слой отделяют и фильтруют в ту же колбу через тот же фильтр. Объединенные хлороформные извлечения доводят хлороформом до метки и перемешивают (раствор В СО атропина сульфата).

Около 1,0 г (точная навеска) настойки помещают в фарфоровую чашку и выпаривают на кипящей водяной бане досуха. К сухому остатку прибавляют 20 мл воды, 10 мл ацетатного буферного раствора pH 4,5; перемешивают и фильтруют в делительную воронку вместимостью 100 мл. Затем в воронку прибавляют 20 мл хлороформа, 1 мл пикриновой кислоты раствора 1 % и встряхивают в течение 3 мин. После разделения слоев

хлороформное извлечение отделяют и фильтруют через бумажный фильтр, содержащий 2 г натрия сульфата безводного в мерную колбу вместимостью 25 мл. Извлечение повторяют еще раз, используя 5 мл хлороформа. Хлороформный слой отделяют и фильтруют в ту же колбу через тот же фильтр. Объединенные хлороформные извлечения доводят хлороформом до метки и перемешивают (раствор А испытуемого раствора). Измеряют оптическую плотность раствор А испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 402 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют хлороформ.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора В СО атропина сульфата.

Содержание суммы алкалоидов в пересчете на гиосциамин в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 10 \cdot 0{,}5 \cdot 25 \cdot \mathrm{P} \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 100 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 1{,}169 \cdot 100} == \frac{A \cdot a_0 \cdot 0{,}5 \cdot \mathrm{P}}{A_0 \cdot a \cdot 1000 \cdot 1{,}169},$$

где A – оптическая плотность раствора А испытуемого раствора;
A_o – оптическая плотность раствора В СО атропина сульфата;
a – навеска испытуемой настойки, г;
a_o – навеска СО атропина сульфата, г;
P – содержание основного вещества в растворе СО атропина сульфата, %.
1,169 – коэффициент пересчета на гиосциамин.

Испытание четвертого десятичного разведения (D4)

15,0 мл четвертого десятичного разведения (D4) выпаривают на кипящей водяной бане до объема 2-3 мл, остаток переносят с 5 мл воды в делительную воронку, прибавляют 1 мл аммиака раствора и 10 мл эфира. Смесь встряхивают в течение 5 мин, эфирное извлечение отделяют и выпаривают в фарфоровой чашке вместимостью около 10 мл на кипящей водяной бане досуха. Сухой остаток растворяют в 0,1 мл азотной кислоты дымящей и выпаривают на кипящей водяной бане досуха. Сухой остаток растворяют в 1 мл ацетона и прибавляют по каплям 0,2 мл калия гидроксида раствора спиртового 3 %. Фиолетовое окрашивание раствора не должно быть

интенсивнее, чем окрашивание 1,2 мл стандартного раствора, приготовленного из 0,1 мл 0,02 М раствора калия перманганата и 100 мл воды.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Хранить с осторожностью.

Кактус грандифлорус **ФС.2.6.0021.18**
Кактус

Cactus grandiflorus
Cactus

Настойка гомеопатическая матричная **Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Кактус грандифлорус (Кактус) - Cactus grandiflorus (Cactus) настойку гомеопатическую матричную, получаемую из собранных во время цветения свежих побегов кактуса крупноцветкового – *Cactus grandiflorus* (L.) Britten et Rose *(Selenicereus grandiflorus* (L.) Britten et Rose syn. *Cereus grandiflorus* Miller*),* сем. кактусовых – *Cactaceae,* и применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Для получения настойки необходимо:

Кактуса крупноцветкового побегов свежих - 100 г

Спирта этилового 62 % (м/м) или 70 % (о/о) - достаточное количество для получения настойки

Примечание.

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляют по способу 2а ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Описание

Прозрачная жидкость зеленого цвета с характерным запахом.

Подлинность

Приготовление растворов

Приготовление раствора стандартного образца (СО) глютаминовой кислоты. Около 0,05 г СО глютаминовой кислоты помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 100 мл воды, перемешивают до

растворения в ультразвуковой бане при температуре 50 °С. Срок годности раствора 30 сут в прохладном защищенном от света месте.

1. На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 25 мкл настойки и 5 мкл раствора СО глютаминовой кислоты. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, затем помещают в хроматографическую камеру, предварительно насыщенную в течение 2 ч системой растворителей бутанол – уксусная кислота ледяная – вода (80:20:20), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат на воздухе до удаления следов растворителей, обрабатывают нингидрина раствором 0,2 % и нагревают в сушильном шкафу при температуре 100 – 105 °С в течение 5 мин и оценивают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО глютаминовой кислоты в нижней трети должна обнаруживаться зона адсорбции фиолетового цвета.

На хроматограмме настойки в дневном свете должны обнаруживаться не менее 4 зон фиолетового цвета: одна ниже зоны СО глютаминовой кислоты, на уровне зоны СО глютаминовой кислоты и выше 2 зоны. Допускается обнаружение других зон.

2. К 5 мл настойки прибавляют 5 мл реактива Фелинга и нагревают на кипящей водяной бане; должно наблюдаться образование кирпично-красного осадка (восстанавливающие сахара).

Сухой остаток. Не менее 0,28 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,890 до 0,910 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание суммы моносахаров в пересчете на глюкозу в настойке должно быть не менее 0,16 %.

Приготовление раствора стандартного образца (СО) глюкозы. Около 0,14 г (точная навеска) СО глюкозы помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (раствор А СО глюкозы).

10,0 мл раствора А СО глюкозы переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (раствор Б СО глюкозы). Срок годности раствора 5 сут в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С.

Около 10,0 г (точная навеска) настойки помещают в колбу вместимостью 50 мл и нагревают на водяной бане при температуре около 80 °С до удаления запаха спирта. К остатку в колбе прибавляют трехкратный объем спирта 96 % и нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 мин. Образовавшийся осадок отфильтровывают через стеклянный фильтр (16) диаметром 40 мм под вакуумом. Осадок на фильтре промывают 20 мл смеси вода - спирт 96 % (1:3) и количественно переносят в коническую колбу вместимостью 100 мл. К содержимому колбы прибавляют 20 мл серной кислоты раствора 5 %; колбу соединяют с обратным холодильником и нагревают на кипящей водяной бане в течение 2 ч. Извлечение охлаждают и доводят до pH 6,5-7,0 с помощью натрия гидроксида раствора 30 %, контролируя pH потенциометрическим методом. Раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают и фильтруют через бумажный складчатый фильтр «белая лента», отбрасывая первые 5 мл фильтрата (раствор А испытуемого раствора).

В две мерные колбы вместимостью 50 мл помещают по 2,5 мл пикриновой кислоты раствора 1 %, 7,5 мл натрия карбоната раствора 20 % и перемешивают в течение 5 мин. В одну колбу прибавляют 10 мл раствора А испытуемого раствора (раствор Б испытуемого раствора), в другую 5 мл раствора Б СО глюкозы (раствор В СО глюкозы) и перемешивают в течение 1-2 мин. Колбы с содержимым нагревают на кипящей водяной бане в течение

30 мин, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора измеряют с помощью спектрофотометра при длине волны 460 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2,5 мл пикриновой кислоты раствора 1 % и 7,5 мл натрия карбоната раствора 20 %, доведенной водой в мерной колбе вместимостью 50 мл до метки.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора В СО глюкозы в аналогичных условиях.

Содержание суммы моносахаров в пересчете на глюкозу в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 50 \cdot 50 \cdot 10 \cdot 5 \cdot P \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 10 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 50 \cdot 100},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
A_o – оптическая плотность раствора В СО глюкозы;
a_o – навеска СО глюкозы, г;
a – навеска настойки, г;
P – содержание основного вещества в СО глюкозы, %.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Календула оффициналис флорес (4) **ФС.2.6.0022.18**

Calendula officinalis flores (4)

Настойка гомеопатическая матричная **Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Календула оффициналис флорес (4) - Calendula officinalis flores (4) настойку гомеопатическую матричную, получаемую из высушенных цветков ноготков лекарственных (календулы лекарственной) - *Calendula officinalis* L., сем. астровых - *Asteraceae,* и применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Для получения настойки необходимо:

Ноготков лекарственных цветков высушенных - 100 г

Спирта этилового 62 % (м/м) или 70 % (о/о) - достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляется по способу 4 ОФС «Настойки гомеопатические матричные»

Описание

Прозрачная жидкость от желто-оранжевого до светло-коричневого цвета с характерным ароматным запахом.

Подлинность

Приготовление растворов

Раствор стандартного образца (СО) β-каротина. 0,02 г СО β-каротина растворяют в 100 мл хлороформа. Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор стандартных образцов (СО) рутина и хлорогеновой кислоты. 0,0025 г СО рутина и 0,001 г СО хлорогеновой кислоты растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора 3 мес при хранении в хорошо укупоренной упаковке в прохладном защищенном от света месте.

1. На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят полосой 10 мм 20 мкл настойки и 10 мкл раствора СО рутина и хлорогеновой кислоты. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру со смесью растворителей муравьиная кислота безводная - вода - этилацетат (10:10:80) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры и высушивают на воздухе до удаления следов растворителей. Затем пластинку выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100 – 105 ºС в течение 2 – 3 мин, еще теплую обрабатывают последовательно дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира раствором 1 % в спирте 96 %, макрогола 400 раствором спиртовым 5 % и через 10 мин просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО рутина и хлорогеновой кислоты должны обнаруживаться зона адсорбции желтовато-коричневого цвета рутина, выше – зона светло-голубого цвета хлорогеновой кислоты.

На хроматограмме настойки должны обнаруживаться зона желтовато-коричневого цвета на уровне зоны на хроматограмме СО рутина и зона светло-голубого цвета на уровне зоны на хроматограмме СО хлорогеновой кислоты. Допускается обнаружение других зон.

2. 5,0 мл настойки помещают в колбу со шлифом вместимостью 50 мл, прибавляют 10 мл хлороформа, присоединяют к обратному холодильнику, нагревают кипящей на водяной в течение 10 мин и

охлаждают. Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр и выпаривают на кипящей водяной бане до объема 1 мл (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 30 мкл испытуемого раствора и 20 мкл раствора СО β-каротина. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 1 ч смесью растворителей гексан – бензол (85:15), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, помещают в сушильный шкаф и выдерживают при температуре 110 °С в течение 5 мин и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме СО β-каротина должна обнаруживаться зона адсорбции темного цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции темного цвета на уровне зоны на хроматограмме СО β-каротина; допускается обнаружение 2 дополнительных зон адсорбции желто-оранжевого цвета ниже зоны на хроматограмме СО β-каротина и зона на линии старта.

3. К 2 мл настойки прибавляют 0,2 мл раствора железа(III) хлорида 3 %; должно появиться черно-зеленое окрашивание, исчезающее при добавлении серной кислоты разведенной (дубильные вещества).

4. К 1 мл настойки прибавляют 0,5 мл раствора натрия гидроксида 10 %, 0,5 мл пикриновой кислоты насыщенного раствора, нагревают в течение нескольких минут на кипящей водяной бане; должно появиться темно-красное окрашивание (восстанавливающие сахара).

5. К 1 мл настойки прибавляют 8 мл воды и интенсивно встряхивают; должна образоваться обильная устойчивая пена (сапонины).

6. 10 мл препарата помещают в фарфоровую чашку и

выпаривают на кипящей водяной бане до объема около 2 мл. К полученному остатку прибавляют 0,2 г магния порошка, постепенно приливают 0,5 мл кислоты хлористоводородной концентрированной, должно наблюдаться образование окрашивания коричнево-красного цвета (флавоноиды).

Сухой остаток. Не менее 2 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,890 до 0,910 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в настойке должно быть не менее 0,05 %.

Приготовление растворов.

Приготовление раствора стандартного образца (СО) рутина. Около 0,05 г (точная навеска) СО рутина, высушенного при температуре 100-105 °С в течение 1,5 ч, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 20 мл спирта 70 %, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки, перемешивают (раствор А СО рутина). Срок годности раствора 30 сут.

0,5 мл раствора А СО рутина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл прибавляют 3 мл алюминия хлорида раствора 3 % в спирте 70 % и 1 каплю уксусной кислоты раствора 3 % (раствор Б СО рутина).

По 0,5 г (точная навеска) настойки помещают в две мерные колбы вместимостью 25 мл, в первую колбу прибавляют 3 мл алюминия хлорида раствора 3 % в спирте 70 %, 1 каплю уксусной кислоты раствора 3 % (раствор А испытуемого раствора), а во вторую колбу - 1 каплю уксусной

кислоты раствора 3 %, доводят объем растворов в обеих колбах спиртом 70 % до метки и перемешивают.

Через 40 мин измеряют оптическую плотность раствора А испытуемого раствора при длине волны 410 нм, в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор из второй колбы.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО рутина.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 25 \cdot 0{,}5 \cdot P \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100},$$

где A – оптическая плотность раствора А испытуемого раствора;
A_0 – оптическая плотность раствора Б СО рутина;
a_0 – навеска СО рутина, г;
a – навеска настойки, г;
P – содержание основного вещества в СО рутина, %.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Календула оффициналис херба **ФС.2.6.0023.18**
Календула

Calendula officinalis herba
Calendula

Настойка гомеопатическая матричная **Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Календула оффициналис херба (Календула) - Calendula officinalis herba (Calendula) настойку гомеопатическую матричную, получаемую из свежей цветущей травы, срезанной до половины высоты растения, ноготков лекарственных (календулы лекарственной) - *Calendula officinalis* L., сем. астровых – *Asteraceae,* и применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Для получения настойки необходимо:

Ноготков лекарственных травы свежей - 100 г

Спирта этилового 86 % (м/м) или 90 % (о/о) - достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляется по способу 3 ОФС «Настойки гомеопатические матричные»

Описание

Прозрачная жидкость от желто-зеленого до зелено-коричневого цвета с характерным ароматным запахом.

Подлинность

1. Тонкослойная хроматография

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором наносят 20 мкл настойки и 5 мкл раствора СО рутина (см. «Количественное определение») в виде точки. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе и помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 40 мин смесью растворителей бутанол – уксусная кислота ледяная – вода (4:1:1) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат при комнатной температуре и просматривают УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО рутина должна обнаруживаться зона адсорбции коричневато-зеленого или зеленого цвета.

На хроматограмме настойки должны обнаруживаться зоны адсорбции по возрастанию от линии старта: серого цвета, растянутая сероватого цвета, желто-зеленого, коричневато-зеленого на уровне зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО рутина, одна - две коричневато-зеленого цвета, голубоватого, розоватого или желтовато-розового; допускается обнаружение других зон коричневато-зеленого или серого цвета.

Затем пластинку обрабатывают раствором диазореактива и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО рутина зона адсорбции оранжевого цвета.

На хроматограмме настойки должны обнаруживаться зоны адсорбции оранжевого цвета на уровне зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО рутина; допускается обнаружение других зон.

2. К 2 мл настойки прибавляют 0,2 мл раствора железа(III) хлорида 3 %; должно появиться черно-зеленое окрашивание, исчезающее при добавлении серной кислоты разведенной (дубильные вещества).

3. К 1 мл настойки прибавляют 8 мл воды и интенсивно встряхивают; должна образоваться обильная устойчивая пена (сапонины).

4. 10 мл настойки помещают в фарфоровую чашку и выпаривают на кипящей водяной бане до объема около 2 мл. К полученному остатку прибавляют 0,2 г магния порошка, постепенно приливают 0,5 мл кислоты хлористоводородной концентрированной, должно наблюдаться коричнево-красное окрашивание (флавоноиды).

Сухой остаток. Не менее 1 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,895 до 0,916 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в настойке должно быть не менее 0,015 %.

Приготовление растворов.

*Приготовление раствора стандартного образца (СО) рутин*а. Около 0,05 г (точная навеска) СО рутина, высушенного при температуре 100 - 105 °С в течение 1,5 ч, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл растворяют в 20 мл спирта 70 %, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки, перемешивают (раствор А СО рутина). Срок годности раствора 30 сут.

0,5 мл раствора А СО рутина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл прибавляют 3 мл алюминия хлорида раствора 3 % в спирте 70 % и 1 каплю уксусной кислоты раствора 3 % (раствор Б СО рутина).

По 1,0 г (точная навеска) настойки помещают в две мерные колбы вместимостью по 25 мл, в первую колбу прибавляют 3 мл алюминия хлорида раствора 3 % в спирте 70 % и 1 каплю уксусной кислоты

раствора 3 % (раствор А испытуемого раствора), а во вторую 1 каплю уксусной кислоты раствора 3 %, доводят объем растворов в обеих колбах спиртом 70 % до метки и перемешивают.

Через 40 мин измеряют оптическую плотность раствора А испытуемого раствора при длине волны 410 нм, в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор из второй колбы.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО рутина.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в настойке в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 25 \cdot 0{,}5 \cdot P \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100},$$

где A – оптическая плотность раствора А испытуемого раствора;
A_0 – оптическая плотность раствора Б СО рутина;
a_0 – навеска СО рутина, г;
a – навеска настойки, г;
P – содержание основного вещества в СО рутина, %.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Калиум броматум	**ФС.2.6.0024.18**
Kalium bromatum	**Вводится первые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на фармацевтическую субстанцию Калиум броматум - Kalium bromatum и получаемые из нее разведения, используемые в качестве субстанции для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Субстанция должна соответствовать требованиям ФС «Калия бромид» по всем показателям.

Калия бромид

KBr М. м. 119,00

Содержит не менее 99,0 % и не более 101,0 % калия бромида KBr в пересчете на сухое вещество.

Разведения

Тритурация D1 (первое десятичное) должна содержать не менее 9,2 % и не более 10,6 % KBr.

Раствор D1 (первое десятичное разведение) должен содержать не менее 9,2 % и не более 10,6 % KBr.

Особенности технологии разведений

Раствор D1 готовят в соответствии с ОФС «Растворы и жидкие разведения гомеопатические» с использованием спирта 15 % (по массе).

Тритурации готовят в соответствии с ОФС «Тритурации гомеопатические».

Описание

Раствор D1 – прозрачная, бесцветная жидкость.

Тритурация D1 – порошок белого цвета.

Подлинность. Раствор D1 или раствор 1,0 г тритурации D1 в 10 мл воды дают характерную реакцию А на бромиды и характерную реакцию Б на калий (ОФС «Общие реакции на подлинность»).

Плотность. Раствор D1: От 1,037 до 1,046 (ОФС «Плотность»).

Прозрачность. Раствор D1 должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

Цветность. Раствор D1 должен быть бесцветным (ОФС «Степень окраски жидкостей», метод 2).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение

Около 10,0 *г (*точная навеска) раствора D1 разводят 50 мл воды или около 2,0 *г (*точная навеска) тритурации D1 растворяют в 50 мл воды (испытуемый раствор).

К испытуемому раствору прибавляют 5 мл азотной кислоты разведенной 12,5 %, доводят объем раствора водой до 50 мл и титруют 0,1 М раствором серебра нитрата. Далее проводят определение по методике, приведенной для субстанции «Калия бромид».

Хранение. В плотно закрытой упаковке.

Калиум иодатум	**ФС.2.6.0025.18**
Калиум йодатум	
Kalium iodatum	
Kalium jodatum	**Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на фармацевтическую субстанцию Калиум йодатум (Калиум йодатум) - Kalium iodatum (Kalium jodatum) и получаемые из нее разведения, используемые в качестве субстанции для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Субстанция должна соответствовать требованиям требования ФС «Калия йодид» по всем показателям.

Калия йодид

KI М. м. 166,01

Содержит не менее 99,0 % калия йодида KI в пересчете на сухое вещество.

Разведения

Раствор D1 (первое десятичное разведение) должен содержать не менее 9,3 % и не более 10,6 % KI.

Тритурация D1 (первое десятичное) должна содержать не менее 9,3 % и не более 10,6 % KI.

Особенности технологии разведений

Раствор D1 готовят в соответствии с ОФС «Растворы и жидкие разведения гомеопатические» с использованием спирта 43 % (по массе).

Тритурации готовят в соответствии с ОФС «Тритурации гомеопатические».

Описание

Раствор D1 – прозрачная, бесцветная жидкость.

Тритурация D1 – порошок белого цвета.

Подлинность. Раствор D1 или раствор 1,0 г тритурации D1 в 10 мл воды дают характерные реакции на калий и йодиды (ОФС «Общие реакции на подлинность»).

Плотность. Раствор D1: От 0,995 до 1,010 (ОФС «Плотность»).

Прозрачность. Раствор D1 должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

Цветность. Раствор D1 должен быть бесцветным (ОФС «Степень окраски жидкостей», метод 2).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение

Определение проводят по методике, приведенной для субстанции «Калия йодид», используя раствор, приготовленный из 3,0 г (точная навеска) раствора D1 или тритурации D1 (точная навеска) в 30 мл воды.

Хранение. В плотно закрытой упаковке. Хранить с осторожностью.

Калиум хлоратум	**ФС.2.6.0026.18**
Kalium chloratum	**Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на фармацевтическую субстанцию Калиум хлоратум - Kalium chloratum и получаемые из нее разведения, используемые в качестве субстанции для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Субстанция должна соответствовать требованиям ФС «Калия хлорид» по всем показателям.

Калия хлорид

KCl М.м. 74,55

Субстанция одержит не менее 99,0 % калия хлорида KCl в пересчете на сухое вещество для субстанции, предназначенной для производства нестерильных лекарственных препаратов.

Субстанция содержит не менее 99,5 % калия хлорида KCl в пересчете на сухое вещество для субстанции, предназначенной для производства лекарственных препаратов для парентерального применения.

Разведения

Тритурация D1 (первое десятичное) должна содержать не менее 9,4 % и не более 10,6 % KCl.

Раствор D1 (первое десятичное разведение) должно содержать не менее 9,4 % и не более 10,6 % KCl.

Особенности технологии разведений

Раствор D1 готовят в соответствии с ОФС «Растворы и жидкие разведения гомеопатические» с использованием спирта 15 % (по массе).

Тритурации готовят в соответствии с ОФС «Тритурации гомеопатические».

Описание

Раствор D1 – прозрачная, бесцветная жидкость.

Тритурация D1 – порошок белого цвета.

Плотность. От 1,037 до 1,046 (ОФС «Плотность»).

Подлинность. Раствор D1 или раствор 1,0 г тритурации D1 в 10 мл воды дают характерные реакцию А на хлориды и характерную реакцию Б на калий (ОФС «Общие реакции на подлинность»).

Плотность. Раствор D1: От 1,045 до 1,057 (ОФС «Плотность»).

Прозрачность. Раствор D1 должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

Цветность. Раствор D1 должен быть бесцветным (ОФС «Степень окраски жидкостей», метод 2).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение

Около 1,0 *г (*точная навеска) раствора D1 разводят водой до 100 мл или около 1,0 *г (*точная навеска) тритурации D1 растворяют в 100 мл воды (испытуемый раствор).

Далее проводят определение по методике, приведенной для субстанции «Калия хлорид».

Хранение. В плотно закрытой упаковке.

Кверкус (4) **ФС.2.6.0027.18**

Querqus (4)

Настойка гомеопатическая матричная **Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Кверкус (4) - Querqus (4) настойку гомеопатическую матричную, получаемую из высушенной коры дуба обыкновенного *Querqus robur* L., и дуба скального *Querqus petrea* Liebl., сем. буковых – *Fagaceae,* применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Для получения настойки необходимо

Дуба коры высушенной - 100 г

Спирта этилового 62 % (м/м), 70 % (о/о) - достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляют из измельченного сырья (0,71 мм) по способу 4 ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Описание

Жидкость красно-коричневого цвета, с характерным запахом.

Подлинность

1. Тонкослойная хроматография.

На линию старта аналитической хроматографической пластинки наносят 20 мкл настойки и 1 мкл раствора стандартного образца (СО) галловой кислоты (см. «Количественное определение») в виде точки. Пластинку сушат на воздухе и помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин смесью растворителей этилацетат –

хлороформ – муравьиная кислота безводная (40:50:10) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат при температуре 40 – 50 °С в течение 5 мин и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО галловой кислоты обнаруживается зона адсорбции серого цвета.

На хроматограмме настойки должны обнаруживаться зоны адсорбции (по возрастанию): темно-коричневого цвета, серого или бледно-серого цвета на уровне зоны адсорбции СО галловой кислоты, серого цвета, ярко-голубого цвета, фиолетового или бледно-фиолетового цвета, бледно-желтого или коричневатого; допускается наличие других зон адсорбции сероватого цвета.

2. К 0,5 мл настойки прибавляют 5 мл воды и перемешивают, прибавляют 0,5 мл железа(III) хлорида раствора 3 %; должно наблюдаться темно-зеленое или черно-зеленое окрашивание (фенольные соединения).

4. К 1 мл настойки прибавляют 0,5 мл железа(III) аммония сульфата раствора 30 %; должно наблюдаться черно-синее окрашивание (дубильные вещества).

Сухой остаток. Не менее 1,0 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,885 до 0,905 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание суммы фенольных соединений в пересчете на галловую кислоту в настойке должно быть не менее 0,2 %.

Приготовление раствора стандартного образца (СО) галловой кислоты. Около 0,015 г (точная навеска) галловой кислоты, высушенной при температуре 100 ºС, растворяют в 8 мл спирта 70 % в мерной колбе вместимостью 10 мл, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор А СО галловой кислоты). Срок годности раствора 30 сут.

1 мл раствора А СО галловой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивают. 5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивают (раствор Б СО галловой кислоты).

Около 1,0 г (точная навеска) настойки помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят спиртом 70 % до метки и перемешивают. (раствор А испытуемого раствора). 5,0 мл раствора А испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора) Измеряют оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 270 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют спирт 70 %.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО галловой кислоты. В качестве раствора сравнения используют спирт 70 %.

Содержание веществ фенольного характера в пересчете на галловую кислоту в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X\ \frac{A \cdot a_0 \cdot 50 \cdot 50 \cdot 1 \cdot 5 \cdot P \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 5 \cdot 10 \cdot 25 \cdot 50 \cdot 100},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
A_0 – оптическая плотность раствора Б СО галловой кислоты;
a_0 – навеска СО галловой кислоты, г;
a – навеска настойки, г;
P – содержание основного вещества в СО галловой кислоты, %.

или по формуле:

$$X = \frac{50 \cdot 50 \cdot A}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 5},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;

$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения галловой кислоты, при длине волны 270 нм равный 527;

а – навеска настойки, г.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Коффея арабика **ФС.2.6.0028.18**
Коффея (4)

Coffea arabica
Coffea (4)

Настойка гомеопатическая матричная **Взамен 42-0194-07**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Коффея арабика (Коффея) (4)- Coffea arabica (Coffea) (4) настойку гомеопатическую матричную, получаемую из высушенных, очищенных от оболочек, необжаренных семян кофейного дерева - *Coffea arabica* L., сем. мареновых - *Rubiaceae* и применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных средств.

Для получения настойки необходимо:

Кофе семян высушенных, очищенных от оболочек, необжаренных (измельченных до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,7 мм)	- 100 г
Спирта этилового 62 % (м/м) или 70 % (о/о)	- достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляется по способу 4 ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Описание

Прозрачная жидкость желтого цвета, характерного запаха.

Подлинность

1. Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов

Калия йодида йодированный раствор подкисленный. 1,0 г йода и 10,0 г калия йодида растворяют в 98 мл воды, затем приливают 2 мл уксусной кислоты и перемешивают.

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 20 мкл настойки и 5 мкл раствора СО кофеина (см. Количественное определение») в виде точки. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе в течение 15 мин и помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 40 мин смесью растворителей хлороформ – спирт 96 % (90:10) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат при температуре 100 °С в течение 10 мин, обрабатывают калия йодида йодированным раствором подкисленным, затем хлористоводородной кислотой разведенной 8,3 %, сушат и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО кофеина должна обнаруживаться зона адсорбции коричневого или фиолетово-коричневого цвета.

На хроматограмме настойки должна обнаруживаться зона адсорбции коричневого или фиолетово-коричневого цвета на уровне зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО кофеина; допускается обнаружение зоны коричневатого цвета, зоны желтого цвета на линии старта.

2. 1 мл настойки помещают в пробирку вместимостью 5 мл, прибавляют 0,1 мл железа(III) хлорид раствора 3 %; должно наблюдаться появление черно-зеленого окрашивания. К смеси осторожно прибавляют по стенке пробирки 1 мл серной кислоты концентрированной; граница раздела фаз должна окраситься в темно-красный или коричневато-красный цвет, верхняя фаза – в коричневый цвет (гликозиды).

3. К 1 мл настойки прибавляют 1 мл аммиака раствора 10 % и осторожно нагревают на водяной бане при температуре около 70 °С; должно

постепенно появиться зеленое окрашивание (кофеин, пуриновые основания).

4. На фильтровальную бумагу наносят пипеткой 0,05 мл настойки, сушат; в УФ-свете при длине волны 365 нм должна наблюдаться флуоресценция голубого цвета (кофеин).

Сухой остаток. Не менее 1,5 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,890 до 0,905 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание кофеина в настойке должно быть не менее 0,06 %.

Приготовление раствора стандартного образца (СО) кофеина. Около 0,015 г (точная навеска) СО кофеина, растворяют в мерной колбе вместимостью 100 мл в 50 мл спирта 96 %, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор А СО кофеина). Срок годности раствора 30 сут.

2,0 мл раствора А СО кофеина, помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, объем раствора доводят спиртом 70 % до метки и перемешивают (раствор Б СО кофеина).

Около 5,0 г (точная навеска) настойки помещают в делительную воронку вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл хлористоводородной кислоты разведенной8,3 %, 15 мл этилацетата и встряхивают в течение 10 мин. Отделяют нижнюю фазу в колбу. Экстракцию повторяют еще два раза с 10 мл и 5 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 %. Объединенные кислотные извлечения помещают в делительную воронку, прибавляют 10 мл этилацетата и встряхивают в течение 10 мин. Этилацетатное извлечение отбрасывают. Кислотное извлечение помещают в делительную воронку вместимостью 200 мл, прибавляют 25 мл аммиака раствора, 25 мл хлороформа и встряхивают в течение 10 мин. Хлороформное

извлечение отделяют в колбу. Экстракцию повторяют еще два раза по 20 мл хлороформа. Объединенные хлороформные извлечения промывают два раза по 50 мл воды, осторожной взбалтывая, затем отделяют и фильтруют через бумажный складчатый фильтр с 10 г натрия сульфата безводного в круглодонную колбу. Фильтр промывают 10 мл хлороформа, последний присоединяют к извлечению. Растворитель отгоняют под вакуумом с помощью роторного испарителя при нагревании на кипящей водяной бане досуха. Сухой остаток растворяют в 25 мл спирта 70 % (раствор А испытуемого раствора).

2,0 мл раствора А испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят спиртом 70 % объем раствора до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора).

Измеряют оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 273 нм, в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют спирт 70 %.

Параллельно аналогичным образом измеряют оптическую плотность раствора Б СО кофеина.

Содержание кофеина в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 25 \cdot 25 \cdot 2 \cdot 100 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot 2 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
A_0 – оптическая плотность поглощения раствора Б СО кофеина;
a – навеска испытуемой настойки, г;
a_0 – навеска СО кофеина г;
P – содержание основного вещества в СО кофеина, %.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Коффея тоста (4) **ФС.2.6.0029.18**

Coffea tosta (4)

Настойка гомеопатическая матричная **Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяются на Коффея тоста (4) - Coffea tosta (4) настойку гомеопатическую матричную, получаемую из высушенных, очищенных от оболочек, обжаренных семян кофейного дерева – *Coffea arabica* L., сем. мареновых – *Rubiaceae* и применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Для получения настойки необходимо:

Кофе семян, высушенных, очищенных от оболочек, обжаренных (измельченных до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,7 мм)	- 100 г
Спирта этилового 62 % (м/м) или 70 % (о/о)	- достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляется по способу 4 ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Описание

Прозрачная жидкость от желтого до светло-коричневого цвета, с характерным запахом.

Подлинность

1. Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов

Калия йодида йодированного раствор подкисленный. 1,0 г йода и 10,0 г калия йодида растворяют в 98 мл воды, затем приливают 2 мл уксусной кислоты и перемешивают.

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 20 мкл настойки и 5 мкл раствора СО кофеина (см. «Количественное определение»). Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе в течение 15 мин, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 40 мин смесью растворителей хлороформ – спирт 96 % (90:10) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат при температуре 100 -105 °С в течение 10 мин, обрабатывают калия йодида йодированным раствором подкисленным, затем хлористоводородной кислотой разведенной 8,3 % и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО кофеина должна обнаруживаться зона адсорбции коричневого или фиолетово-коричневого цвета.

На хроматограмме настойки должна обнаруживаться зона адсорбции коричневого или фиолетово-коричневого цвета на уровне зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО кофеина; допускается обнаружение зоны коричневатого цвета, зоны желтого цвета на линии старта.

2. 1 мл настойки помещают в пробирку вместимостью 5 мл, прибавляют 0,1 мл железа(III) хлорид раствора 3 %; должно наблюдаться появление черно-зеленого окрашивания. К смеси осторожно прибавляют по стенке пробирки 1 мл серной кислоты концентрированной; граница раздела фаз должна окраситься в темно-красный или коричневато-красный цвет,

верхняя фаза – в коричневый цвет (фенольные соединения).

3. К 1 мл настойки прибавляют 1 мл аммиака раствора 10 % и осторожно нагревают на водяной бане при температуре около 70 С; должно постепенно появиться зеленое окрашивание (алкалоиды).

Сухой остаток. Не менее 1,5 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,890 до 0,905 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание кофеина в настойке должно быть не менее 0,08 %.

Приготовление раствора стандартного образца (СО) кофеина. Около 0,015 г (точная навеска) СО кофеина растворяют в 100 мл спирта 96 %, перемешивают (раствор А СО кофеина). Срок годности раствора 30 сут.

2,0 мл раствора А СО кофеина, помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, объем раствора доводят 70 % спиртом до метки и перемешивают (раствор Б СО кофеина).

Около 5,0 г (точная навеска) настойки помещают в делительную воронку вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 %, 15 мл этилацетата и встряхивают в течение 10 мин. Отделяют нижнюю фазу в колбу. Экстракцию повторяют еще два раза с 10 мл и 5 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 %. Объединенные кислотные извлечения помещают в делительную воронку, прибавляют 10 мл этилацетата и встряхивают в течение 10 мин. Этилацетатное извлечение отбрасывают. Кислотное извлечение количественно переносят в делительную воронку вместимостью 200 мл,

прибавляют 25 мл аммиака раствора, 25 мл хлороформа и встряхивают в течение 10 мин. Хлороформное извлечение отделяют в колбу. Экстракцию повторяют еще два раза, используя по 20 мл хлороформа. Объединенные хлороформные извлечения промывают два раза по 50 мл воды, осторожно взбалтывая, затем отделяют и фильтруют через бумажный складчатый фильтр с 10 г натрия сульфата безводного в круглодонную колбу. Фильтр промывают 10 мл хлороформа, который присоединяют к извлечению. Хлороформ отгоняют под вакуумом с помощью роторного испарителя при нагревании на кипящей водяной бане досуха. Сухой остаток растворяют в 25 мл спирта 70 % (раствор А испытуемого раствора).

2,0 мл раствора А испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят спиртом 70 % объем раствора до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора).

Измеряют оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 273 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют спирт 70 %.

Параллельно аналогичным образом измеряют оптическую плотность раствора Б СО кофеина.

Содержание кофеина в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{\mathrm{A} \cdot a_0 \cdot 25 \cdot 25 \cdot 2 \cdot P \cdot 100}{\mathrm{A}_0 \cdot a \cdot 2 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
A_0 – оптическая плотность раствора Б СО кофеина;
a_0 – навеска СО кофеина, г;
a – навеска настойки, г;
P - содержание основного вещества в СО кофеина, %.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Колхикум аутумнале **ФС.2.6.0030.18**
Колхикум

Colchicum autumnale
Colchicum

Настойка гомеопатическая матричная **Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Колхикум аутумнале (Колхикум) - Colchicum autumnale (Colchicum) настойку гомеопатическую матричную, получаемую из свежих клубнелуковиц, собранных весной безвременника осеннего - *Colchicum autumnale* L., сем. лилейных – *Liliaceae*, и применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных средств.

Для получения настойки необходимо:

Безвременника осеннего клубнелуковиц свежих	- 100 г
Спирта этилового 86 % (м/м) или 90 % (о/о)	- достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляют по способу 2 ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Описание

Прозрачная жидкость от желтовато-коричневого до красновато-коричневого цвета с характерным запахом.

Подлинность

1. Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов

Раствор стандартного образца (СО) колхицина. Около 0,01 г СО колхицина растворяют в 10 мл спирта 96 %.

Раствор стандартного образца (СО) колхамина. Около 0,01 г СО колхамина растворяют в 10 мл спирта 96 %.

Натрия хлорида раствор 0,1 %. Раствор 1 г/л.

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят раздельно полосами длиной 10 мм по 10 мкл настойки и растворов СО колхицина и СО колхамина. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в хроматографическую камеру, предварительно насыщенную в течение 1 ч смесью бутанол - уксусная кислота ледяная - вода (40:10:10) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и рассматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО колхицина должна обнаруживаться зона светло-коричневого цвета.

На хроматограмме раствора СО колхамина должна обнаруживаться зона коричневого цвета выше зоны на хроматограмме раствора СО колхицина.

На хроматограмме испытуемой настойки должны обнаруживаться (по возрастанию от линии старта) зоны: ярко-голубого цвета, светло-коричневого цвета на уровне зоны на хроматограмме раствора СО колхицина, коричневого цвета на уровне зоны на хроматограмме раствора СО колхамина, светло-коричневого цвета и ярко-голубого цвета; допускается обнаружение дополнительных зон.

2. К 5 мл настойки прибавляют 5 мл натрия хлорида раствора 0,1 %, 10 мл этилацетата и встряхивают; отделяют органическую фазу, переносят в фарфоровую чашку и упаривают досуха на водяной бане. К остатку

прибавляют 0,2 мл серной кислоты концентрированной, появляется желтое окрашивание. К смеси прибавляют 0,2 мл кислоты азотной концентрированной; окраска изменяется на фиолетовую (алкалоиды).

Сухой остаток. Не менее 2,0 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,930 до 0,950 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение

Содержание суммы алкалоидов колхицина и колхамина в настойке должно быть не менее 0,06 % и не более 0,12 %, в пересчете на колхицин.

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) колхицина. Около 0,01 г (точная навеска) СО колхицина помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным и защищают от света.

Проверка пригодности хроматографической системы.

Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки должна быть не менее 3000 теоретических тарелок для пика колхицина и не менее 7000 для пика колхамина;

- коэффициент симметрии для пиков колхицина и колхамина должен быть не менее 0,8 и не более 1,5.

- относительное стандартное отклонение площади пика колхицина, рассчитанное по 3 последовательным хроматограммам раствора стандартного образца не более 2,0 %.

Около 1,0 г настойки (точная навеска) помещают в мерную колбу

вместимостью 10 мл, доводят объем раствора подвижной фазой до метки и перемешивают (испытуемый раствор).

Условия хроматографирования

Колонка	150 × 4,6 мм, эндкепированный октадецил (C_{18}) силикагель для хроматографии, 5 мкм.
Подвижная фаза	**А** –0.05 % раствор водный трифторуксусной кислоты; **В**- 0.05 % раствор трифторуксусной кислоты в ацетонитриле;
Способ элюирования	программа градиента

Время, мин	**А, об. %**	**В, об. %**
0 – 11	77	23
11 – 13	77→50	23→50
13-15	50	50
15-16	50→77	50→23
16 – 20	77	23

Скорость потока, мл/мин	1,5
Температура колонки, °С	25 ± 2
Детектор	спектрофотометрический или диодная матрица
Длина волны, нм	350
Объем вводимой пробы, мкл	1
Время хроматографирования (интегрирования)	20 мин (время интегрирования 15 мин)

Хроматографируют раствор СО колхицина, получая не менее 3 хроматограмм. Результаты считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Хроматографируют попеременно испытуемый раствор и раствор СО

колхицина, получая не менее 3 хроматограмм. Расчет содержания суммы алкалоидов проводят методом внешнего стандарта. Обсчету подлежат 2 основных пика: пик колхицина и пик колхамина с относительным временем удерживания 0,35 (по колхицину).

Содержание суммы алкалоидов колхицина и колхамина в пересчете на колхицин в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot 10 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot 10 \cdot a \cdot 100},$$

где: S – сумма площадей двух пиков алкалоидов на хроматограмме испытуемого раствора;
a_0 – навеска СО колхицина, г;
P – содержание колхицина в СО, %;
S_0 – площадь пика на хроматограмме СО колхицина;
a – навеска настойки, г.

Испытание четвертого десятичного разведения (D4)

Измеряют оптическую плотность разведения D4 при длине волны 230 нм по отношению к спирту 43 % (по массе). Оптическая плотность разведения D4 должна быть не более 0,10.

Примечание

Приготовление четвертого десятичного разведения D4 производят в соответствии с ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Хранить с осторожностью.

Кратегус **ФС.2.6.0031.18**

Crataegus

Настойка гомеопатическая матричная **Взамен ФС 42-0109-03**

Настоящая фармакопейная статья распространяются на Кратегус - Crataegus настойку гомеопатическую матричную, получаемую из свежих зрелых плодов боярышника однопестичного – *Crataegus monogyna* Jacq. или боярышника сглаженного – *Crataegus laevigata* (Poir.) DC, сем. розоцветных – *Rosaceae*, применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Для получения настойки необходимо:

Боярышника однопестичного или сглаженного зрелых плодов свежих	- 100 г
Спирта этилового 94 % (м/м) или 96 % (о/о)	- достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляется по способу 2 ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Описание

Прозрачная жидкость коричневого или красновато-коричневого цвета с характерным запахом.

Подлинность

1. Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов

Раствор стандартного образца (СО) гиперозида. Около 0,003 г СО гиперозида растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят полосой длиной 10 мм 30 мкл настойки и рядом 2 мкл раствора СО гиперозида. Пластинку с нанесенными пробами высушивают на воздухе и помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 60 мин смесью растворителей бутанол – уксусная кислота ледяная – вода (9:1:0,5) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат на воздухе до удаления следов растворителей и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО гиперозида должна обнаруживаться зона адсорбции темно-коричневого цвета выше середины пластинки.

На хроматограмме настойки должна обнаруживаться зона адсорбции темно-коричневого цвета на уровне зоны адсорбции раствора СО гиперозида, а также менее интенсивная зона адсорбции коричневого цвета ниже, и одна зона адсорбции коричневого цвета выше зоны адсорбции раствора СО гиперозида – в верхней трети пластинки.

Затем пластинку обрабатывают алюминия хлорида спиртовым раствором 5 %, выдерживают при температуре 100-105 °С в течение 5 мин и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО гиперозида должна обнаруживаться зона адсорбции с флюоресценцией ярко-желтого цвета.

На хроматограмме настойки должны обнаруживаться две зоны адсорбции ниже зоны гиперозида: с флюоресценцией голубого цвета, далее над ней с флюоресценцией ярко-желтого цвета; затем одна зона адсорбции с флюоресценцией ярко-желтого цвета на уровне зоны адсорбции раствора СО гиперозида; и две зоны адсорбции с флюоресценцией голубого и ярко-желтого цвета выше зоны адсорбции раствора СО гиперозида. Допускается обнаружение других зон адсорбции.

2. К 2 мл настойки прибавляют 0,1 мл железа(III) хлорида раствора 1 %; должно наблюдаться темно-зеленое окрашивание (дубильные вещества).

3. К 1 мл настойки прибавляют 1 мл медно-тартратного реактива и нагревают до кипения; должно наблюдаться выпадение оранжево-красного осадка (восстанавливающие сахара).

Сухой остаток. Не менее 5,5 % (ГФ «Настойки»).

Плотность. От 0,940 до 0,970 («Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид в настойке должно быть не менее 0,004 %.

Приготовление растворов.

Приготовление раствора стандартного образца (СО) гиперозида. Около 0,05 г (точная навеска) СО гиперозида, предварительно высушенного при температуре 100-105 °С в течение 1,5 час, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 20 мл спирта 96 %, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки, перемешивают (раствор А СО гиперозида). Срок годности раствора 30 сут.

2,0 мл раствора А СО гиперозида помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 3 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 % и 0,1 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, (раствор Б гиперозида).

Около 5,0 г (точная навеска) настойки помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 6 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 %, 0,1 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (испытуемый раствор). Оптическую плотность испытуемого раствора измеряют на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 5,0 г настойки, 0,1 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, помещенный в мерную колбу вместимостью 25 мл и доведенный спиртом 96 % до метки.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО гиперозида. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2,0 мл раствора А СО гиперозида, 0,1 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, помещенный в мерную колбу вместимостью 25 мл и доведенный спиртом 96 % до метки.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид в настойке в процентах *(X)* вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 2 \cdot 25 \cdot \text{P} \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;
A_0 – оптическая плотность раствора Б СО гиперозида;
a_0 – навеска СО гиперозида, г;
a – навеска настойки, г;
P – содержание основного вещества в СО гиперозида, %;

Допускается содержание суммы флавоноидов в процентах *(X)* вычислять с использованием удельного показателя поглощения комплекса гиперозида с алюминия хлоридом по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 25}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a},$$

где: A– оптическая плотность испытуемого раствора;
$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса гиперозида с алюминия хлоридом при длине волны 410 нм, равный 380;
a – навеска настойки, г;
25 – разведение настойки, мл.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Ликоподиум клаватум ……..ФС.2.6.0032.18

Ликоподиум

Lycopodium clavatum

Lycopodium

Настойка гомеопатическая матричная Взамен ФС 42-0157-05

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Ликоподиум клаватум (Ликоподиум) - Lycopodium clavatum (Lycopodium) настойку гомеопатическую матричную, получаемую из высушенных спелых спор растения плауна булавовидного – *Lycopodium clavatum* L., сем. плауновых – *Lycopodiaceae*, и применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Для получения настойки необходимо:

Плауна булавовидного спор спелых - 100 г

Спирта 86 % (м/м) или 90 % (о/о) - достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляется по способу 4 ОФС «Настойки гомеопатические матричные», из сырья, предварительно подготовленного подходящим механическим способом до тестообразной массы.

Описание

Жидкость светло-желтого цвета без характерного запаха.

Подлинность

1.Тонкослойная хроматография.

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) ванилина. 0,03 г СО ванилина растворяют в 10 мл метанола. Срок годности 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят полосами длиной 10 мм и шириной не более 2 мм по 10 мкл настойки и раствора СО ванилина. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в хроматографическую камеру, предварительно насыщенную в течение 10 мин смесью растворителей уксусная кислота ледяная – эфир – эфир петролейный (5 : 35 : 60) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и помещают в камеру, предварительно насыщенную парами йода, до появления зон адсорбции коричневого цвета. Удаляют избыток йода в токе холодного воздуха, затем опрыскивают крахмала раствором 1 % и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме СО ванилина в средней трети должна обнаруживаться зона адсорбции голубого цвета.

На хроматограмме настойки должны обнаруживаться не менее 5 зон адсорбции: три зоны адсорбции голубого цвета ниже зоны адсорбции СО ванилина и две зоны адсорбции голубого цвета выше зоны адсорбции СО ванилина; допускается обнаружение других зон адсорбции.

2. 0,5 мл настойки выпаривают на водяной бане досуха. К сухому остатку прибавляют к 0,2 мл серной кислоты концентрированной; должно наблюдаться желтое окрашивание, переходящее в фиолетовое (сложные эфиры).

3. К 2 мл настойки прибавляют 3-4 капли железа(III) хлорида раствора 1 %; должно наблюдаться желтовато-коричневое окрашивание (фенольные соединения).

Сухой остаток. Не менее 0,5 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,825 до 0,845 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание суммы фенольных соединений в пересчете на апигенин должно быть не менее 0,001 % и не более 0,025 %.

Приготовление растворов

Раствор стандартного образца (СО) апигенина. Около 0,01 г (точная навеска) СО апигенина, высушенного до постоянной массы при температуре 100 – 105 °С в течение 1,5 ч, помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 20 мл спирта70 %, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивают (раствор А СО апигенина). Срок годности раствора 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

2,0 мл раствора раствора А СО апигенина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 3 мл алюминия хлорида раствора 3 % в спирте 70 %, 1 каплю уксусной кислоты раствора 3 % и доводят объем раствора спиртом 90 % до метки и перемешивают (раствор Б СО апигенина). Раствор используют свежеприготовленным.

В каждую из двух мерных колб вместимостью по 25 мл помещают около 5 г (точная навеска) настойки; в первую колбу прибавляют 3 мл алюминия хлорида раствора 3 % в спирте 70 % и 1 каплю уксусной кислоты раствора 3 % (испытуемый раствор), а во вторую 1 каплю уксусной кислоты раствора 3 % и доводят объем растворов в обеих колбах спиртом 90 % до метки (раствор сравнения).

Оптическую плотность испытуемого раствора измеряют через 40 мин на спектрофотометре при длине волны 389 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Через 40 мин измеряют оптическую плотность испытуемого раствора в при длине волны 389 нм, в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО апигенина в тех же условиях. В качестве раствора сравнения используют раствор, приготовленный из 2 мл раствора А апигенина, 1 капли уксусной кислоты раствора 3 % и доведенный до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл спиртом 90 %.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на апигенин в настойке в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 25 \cdot 2 \cdot P \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 25 \cdot 25 \cdot 100} = \frac{A \cdot a_0 \cdot 0{,}08 \cdot P}{A_0 \cdot a},$$

где …A_0 – оптическая плотность раствора Б СО апигенина;

A – оптическая плотность испытуемого раствора;

a_0 – навеска СО апигенина, г,

a – навеска настойки, г,

P – содержание основного вещества в СО апигенина, %.

Допускается содержание суммы флавоноидов вычислять с использованием удельного показателя поглощения комплекса апигенина с алюминия хлоридом по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 25}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора,

a – масса настойки в г,

a – навеска настойки в г,

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса апигенина с алюминия хлоридом при длине волны 389 нм, равный 401.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Натриум сульфурикум	**ФС.2.6.0033.18**
Natrium sulfuricum	**Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на фармацевтическую субстанцию Натриум сульфурикум - Natrium sulfuricum и получаемые из нее разведения, используемые в качестве субстанции для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Натрия сульфат безводный

Na_2SO_4 М.м. 142,04

Содержит не менее 98,5 % и не более 101,0 % натрия сульфата Na_2SO_4 в пересчете на сухое вещество.

Описание. Белый или почти белый порошок, гироскопичный.

Растворимость. Очень легко растворим в воде,

Подлинность. Субстанция дает реакции подлинности на натрий и сульфаты (ОФС «Общие реакции на подлинность»).

Прозрачность раствора

2,2 г субстанции растворяют в воде, свободной от углерода диоксида, и доводят объем раствора этим же растворителем до 100 мл.

Полученный раствор должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

Цветность раствора

Раствор, полученный в испытании «Прозрачность раствора», должен быть бесцветным (ОФС «Степень окраски жидкостей»).

Кислотность или щелочность. К 10 мл раствора, полученного в испытании «Прозрачность раствора», прибавляют 0,1 мл раствора бромтимолового синего раствора 0,05 %. При прибавлении не более 0,5 мл 0,01 М раствора кислоты хлористоводородной или 0,01 М раствора натрия гидроксида окраска раствора должна измениться.

Хлориды. Не более 0,045 % (450 ppm, ОФС «Хлориды»). 5 мл раствора, полученного в испытании «Прозрачность раствора», доводят водой до объёма 25 мл. Для определения используют 10 мл полученного раствора.

Кальций. Не более 0,045 % (450 ppm, ОФС «Кальций», метод 2), если субстанция предназначена для производства лекарственных средств для парентерального применения. Для определения используют 10 мл раствора, полученного в испытании «Прозрачность раствора».

Железо. Не более 0,009 % (90 ppm, ОФС «Железо», метод 2), если субстанция предназначена для производства лекарственных средств для парентерального применения. Для определения 5 мл раствора, полученного в испытании «Прозрачность раствора», доводят водой до объёма 10 мл.

Магний. Не более 0,02 % (200 ppm), если субстанция предназначена для производства лекарственных средств для парентерального применения. 1,0 г субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 20 мл, растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки. К 10,0 мл полученного раствора прибавляют 1 мл глицерина 85 %, 0,15 мл титанового желтого раствора 0,05 %, 0,25 мл аммония оксалата раствора 4 %, 5 мл натрия гидроксида раствора 8,5 % и перемешивают. Розовая окраска полученного раствора должна быть не интенсивнее окраски эталона, приготовленного параллельно с использованием 10 мл стандартного раствора магния 0,001 % (10 ppm Mg).

Стандартный раствор магния 0,1 % (1000 ppm). Количество магния сульфата гептагидрата, эквивалентное 1,010 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, растворяют в

воде в мерной колбе вместимостью 100 мл и разбавляют до 100,0 мл тем же растворителем.

Стандартный раствор магния 0,01 % (100 ppm Mg). 10,0 мл стандартного раствора магния 0,1 % (1000 ppm) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объём раствора водой до метки. Раствор используют свежеприготовленным.

Стандартный раствор магния 0,001 % (10 ppm Mg). 10,0 мл стандартного раствора магния 0,01 % (100 ppm) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объём раствора водой до метки. Раствор используют свежеприготовленным.

Тяжёлые металлы. Не более 0,0045% (45 ppm, ОФС «Тяжёлые металлы»). Для определения используют 10 мл раствора, полученного в испытании «Прозрачность раствора».

Потеря в массе при высушивании. Не более 0,5 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Определение проводится на навеске около 1,0 г субстанции при температуре 130 °С.

Количественное определение. 0,100 г субстанции растворяют в 40 мл воды, прибавляют 0,2 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты и 80 мл метанола. Полученный раствор титруют 0,1 М раствором свинца(II) нитрата, конечную точку титрования определяют потенциометрическим методом, используя в качестве индикаторного электрода свинец-селективный электрод, а в качестве электрода сравнения — хлорсеребряный.

1 мл 0,1 М раствора свинца(II) нитрата соответствует 14,20 мг Na_2SO_4.

Разведения

Раствор D2 (второе десятичное разведение) содержит количество натрия сульфата, соответствующее не менее 0,94 % и не более 1,06 % Na_2SO_4.

Тритурация D1 (первая десятичная тритурация) содержит количество натрия сульфата, соответствующее не менее 9,4 % и не более 10,6 % Na_2SO_4.

Особенности технологии разведений

Раствор D2 готовят в соответствии с ОФС «Растворы и жидкие разведения гомеопатические» с использованием спирта этилового 15 % (м/м). Последующие разведения готовят с использованием спирта этилового 43 % (м/м).

Тритурации готовят в соответствии с ОФС «Тритурации гомеопатические» с учётом содержания влаги в исходной субстанции.

Описание

Раствор D2 – прозрачная, бесцветная жидкость.

Тритурация D1 – порошок белого цвета.

Подлинность. Раствор D2 или раствор 1,0 г тритурации D1 в 10 мл воды должны давать реакции подлинности субстанции (ОФС «Общие реакции на подлинность»).

Плотность раствора. От 0,984 до 0,986. В соответствии с ОФС «Плотность».

Прозрачность. Раствор D2 должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»)

Цветность. Раствор D2 должен быть бесцветным (ОФС «Степень окраски жидкостей», метод 2).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение

10,0 г (точная навеска) раствора D2 разводят 40 мл воды или 1,0 г (точная навеска) тритурации D1 растворяют в 50 мл воды (испытуемый раствор).

Метод, приведенный для субстанции, но используя метилового оранжевого смешанный раствор в качестве индикатора и 0,1 М раствор натрия гидроксида. Промывают катионообменную смолу 100 мл воды.

1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида соответствует 7,10 мг Na_2SO_4.

Хранение. В плотно закрытой упаковке.

Натриум тетраборацикум **Боракс** **Natrium tetraboracicum** **Borax**	**ФС.2.6.0034.18** **Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на фармацевтическую субстанцию Натриум тетраборацикум (Боракс) - Natrium tetraboracicum (Borax), и получаемые из нее разведения, используемые в качестве субстанции для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Субстанция должна соответствовать требования ФС «Натрия тетраборат» по всем показателям.

Тетраборат натрия, декагидрат

$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ М.м. 381,37

Содержит не менее 99,0 % и не более 103,0 % натрия тетрабората $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$.

Разведения

Тритурация D1 (первая десятичная тритурация) содержит не менее 9,4 % и не более 10,8 % $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$.

Раствор D2 содержит не менее 0,94 % и не более 1,08 % $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$.

Особенности технологии разведений

Тритурации готовят в соответствии с ОФС «Тритурации гомеопатические».

Раствор D2 готовят в соответствии с ОФС «Растворы, разведения гомеопатические» с использованием спирта этилового 15 % (м/м). Последующие разведения готовят с использованием спирта 43 % (м/м).

Описание

Раствор D2 – бесцветная, прозрачная жидкость.

Тритурация D1 – белый порошок.

Подлинность

1. 2,0 г тритурации D1 растворяют в 5,0 мл воды. Полученный раствор или раствор D2 должен давать характерную реакцию А на натрий (ОФС «Общие реакции на подлинность»).

2. 5 мл раствора D2 выпаривают досуха на водяной бане. К остатку или 0,5 г тритурации D1 прибавляют 1 мл воды, 5 мл спирта 96 % и 0,1 мл серной кислоты концентрированной. При зажигании смесь должна гореть пламенем, окаймленным зеленым цветом.

Прозрачность. Раствор D2 должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

Цветность. Раствор D2 должен быть бесцветным (ОФС «Степень окраски жидкостей», метод 2).

Плотность. Раствор D2: От 0,975 до 0,983 (ОФС «Плотность»).

Микробиологическая чистота. В соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение

Около 5,0 г (точная навеска) тритурации растворяют в 30 мл воды и титруют 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты до розово-оранжевого окрашивания (индикатор – 0,1 мл 0,1 % раствора метилового оранжевого).

или

50 г (точная навеска) раствора D2 титруют 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты до розово-оранжевого окрашивания (индикатор – 0,1 мл 0,1 % раствора метилового оранжевого).

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты соответствует 19,07 мг натрия тетрабората $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$.

Хранение. В плотно закрытой упаковке.

Натриум хлоратум	**ФС.2.6.0035.18**
Natrium chloratum	**Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на фармацевтическую субстанцию Натриум хлоратум - Natrium chloratum, и получаемые из нее разведения, используемые в качестве субстанции для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Субстанция должна соответствовать требования ФС «Натрия хлорид»

Натрия хлорид

NaCl М.м. 58,44

Содержит не менее 99,0 % в пересчете на сухое вещество для субстанции, предназначенной для производства нестерильных лекарственных препаратов натрия хлорида NaCl.

Содержит не менее 99,5 % в пересчете на сухое вещество для субстанции, предназначенной для производства лекарственных препаратов для парентерального применения и глазных капель натрия хлорида NaCl.

Разведения

Тритурация D1 (первая десятичная тритурация) содержит не менее 9,3 % и не более 10,6 % NaCl.

Раствор D1 (первое десятичное разведение) содержит не менее 9,3 % и не более 10,6 % NaCl.

Особенности технологии разведений

Тритурацию D1 готовят в соответствии с ОФС «Тритурации гомеопатические» из порошков.

Раствор D1 готовят в соответствии с ОФС «Растворы и жидкие разведения гомеопатические» (растворы гомеопатические) с использованием спирта этилового 15 % (м/м). Последующие разведения готовят с использованием спирта этилового 43 % (м/м).

Описание

Раствор D1 – бесцветная, прозрачная жидкость.

Тритурация D1 – белый порошок.

Подлинность

1,0 г тритурации D1 растворяют при нагревании в 10,0 мл воды. Полученный раствор или раствор D1 дают реакции подлинности для субстанции.

Прозрачность. Раствор D1 должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

Цветность. Раствор D1 должен быть бесцветным (ОФС «Степень окраски жидкостей»).

Плотность. Раствор D1: От 1,043 до 1,053 (ОФС «Плотность»).

Микробиологическая чистота. В соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение.

10,0 г раствора D1 (точная навеска) разводят 50,0 мл воды или 10,0 г тритурации D1 (точная навеска) растворяют в 50,0 мл воды.

Используют метод, приведенный для субстанции.

Хранение. В плотно закрытой упаковке.

Никотиана табакум **Табакум(4)** **Nicotiana tabacum** **Tabacum (4)** **Настойка гомеопатическая матричная**	**ФС.2.6.0036.18** **Вводятся впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Никотиана табакум (Табакум) (4) - Nicotiana tabacum (Tabacum) (4) настойку гомеопатическую матричную, получаемую из высушенных листьев табака настоящего – *Nicotiana tabacum* L., сем. пасленовых – *Solanaceae,* применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Для получения настойки необходимо:

Табака настоящего листьев высушенных - 100 г

Спирта этилового 62 % (м/м) или 70 % (о/о) - достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляют из измельченного сырья (2 мм) по способу 4 ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Описание. Жидкость от желтовато-коричневого до красновато-коричневого цвета с характерным запахом.

Подлинность.

1. Тонкослойная хроматография

Приготовление раствора стандартного образца (СО) никотина. 0,05 г СО никотина растворяют в 25 мл спирта 40 % и перемешивают. Срок годности раствора 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 10 мкл настойки в виде полосы длинной 1 см и 5 мкл раствора СО никотина в виде точки. Пластинку с нанесенными пробами сушат в сушильном шкафу при температуре 100 ºС в течение 5 мин и помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 1 ч смесью растворителей ацетон - вода - аммиака раствор концентрированный (90:7:3) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают, сушат на воздухе до удаления следов растворителей, обрабатывают реактивом Драгендорфа и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО никотина должна обнаруживаться в верхней трети пластинки зона адсорбции красно-оранжевого цвета на желтом фоне.

На хроматограмме настойки должна обнаруживаться зона адсорбции красно-оранжевого цвета на желтом фоне на уровне зоны раствора СО никотина; допускается обнаружение других слабоокрашенных зон.

2. 10,0 г настойки помещают в делительную воронку, вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл воды, 1 мл аммиака раствора концентрированного 25 %, 20 мл хлороформа и встряхивают в течение 5 мин. После разделения фаз органический слой отделяют и фильтруют через бумажный фильтр с 2,0 г натрия сульфата безводного в выпарительную чашку. Экстракцию повторяют еще раз с таким же количеством хлороформа, фильтруя органический слой через тот же

фильтр в ту же чашку. Объединенное хлороформное извлечение выпаривают на кипящей водяной бане досуха. К сухому остатку прибавляют 0,5 мл азотной кислоты концентрированной и выпаривают на кипящей водяной бане досуха. К сухому остатку прибавляют 10 мл ацетона и по каплям калия гидроксида раствора спиртового 3 % до появления фиолетового окрашивания (алкалоиды).

Сухой остаток. Не менее 1,5 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,880 до 0,920 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание суммы алкалоидов в пересчете на никотин в настойке должно быть не менее 0,15 %.

Приготовление растворов.

Раствор спирта 70 % подкисленного. В мерную колбу вместимостью 250 мл помещают 100 мл спирта этилового 70 %, прибавляют 5 мл хлористоводородной кислоты 2 %, перемешивают, объем раствора доводят спиртом этиловым 70 % до метки, перемешивают. Срок годности раствора 1 мес.

Раствор СО никотина. Около 0,0137 г (точная навеска) СО никотина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 20 мл спирта 70 % подкисленного, перемешивают до растворения и доводят объем раствора до метки (раствор А СО никотина). Срок годности раствора 30 сут.

2 мл раствора А СО никотина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора в колбе до метки спиртом 70 % подкисленным (раствор Б СО никотина). Раствор используют свежеприготовленным.

Около 10,0 г (точная навеска) настойки помещают в выпарительную чашку и выпаривают досуха на кипящей водяной бане. Сухой остаток количественно переносят в делительную воронку с помощью 50 мл хлороформа и встряхивают в течение 5 мин. К раствору в делительной воронке прибавляют 50 мл серной кислоты разведённой 9,8 %, встряхивают в течение 5 мин. После разделения фаз водный слой отделяют, а из органического слоя повторяют экстракцию алкалоидов аналогичным способом еще 2 раза. Затем водные извлечения объединяют, добавляют 3 мл фенолфталеина раствора спиртового и подщелачивают аммиака раствором концентрированным 25 % до pH 8,5 - 9,0. Из полученной смеси алкалоиды извлекают в течение 5 мин с помощью 50 мл хлороформа. Хлороформное извлечение после разделения фаз отделяют, а из водной фазы повторяют извлечение алкалоидов в аналогичных условиях еще 2 раза. Хлороформные извлечения объединяют, промывают водой очищенной до отсутствия щелочной реакции, фильтруют через бумажный складчатый фильтр «белая лента» с 5 г натрия сульфата безводного в круглодонную колбу и упаривают на роторном испарителе досуха. Сухой остаток в колбе количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл с помощью спирта 70 % подкисленного, используя последовательно 20, 20 и 10 мл спирта соответственно. Раствор в колбе перемешивают, доводят объем раствора до метки растворителем и снова перемешивают (раствор А испытуемого раствора).

Через 15 мин измеряют оптическую плотность раствора А испытуемого раствора при длине волны 260 нм на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения спирт 70 % подкисленный.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО никотина.

Содержание суммы алкалоидов в пересчете на никотин в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 50 \cdot 2 \cdot 100 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100} = \frac{A \cdot a_0 \cdot 2 \cdot 100 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot 25 \cdot 100}$$

где A_0 – оптическая плотность раствора Б никотина СО;
A – оптическая плотность раствора А испытуемого раствора;
a – навеска настойки, г;
a_0 – навеска СО никотина, г.
P – содержание основного вещества в СО никотина, %.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Хранить с осторожностью.

Парнасия палюстрис **ФС.2.6.0037.18**
Парнасия

Parnassia palustris
Parnassia

Настойка гомеопатическая матричная **Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяются на Парнасия палюстрис (Парнасия) - Parnassia palustris (Parnassia) настойку гомеопатическую матричную, получаемую из целого цветущего растения белозора болотного - *Parnassia palustris* L., сем. белозоровых - *Parnassiaceae*, и применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Для получения настойки необходимо:

Белозора болотного травы с корнями свежей - 100 г

Спирта этилового 86 % (м/м) или 90 % (о/о) - достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляется по способу 3 ОФС «Настойки гомеопатические матричные»

Описание

Прозрачная жидкость от зеленовато-коричневого до коричневого цвета, с характерным ароматным запахом.

Подлинность

1. Тонкослойная хроматография

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 10 мкл настойки и 5 мкл раствора СО рутина (см. «Количественное определение», раствор А СО рутина). Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе и помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 40 мин смесью растворителей бутанол - уксусная кислота ледяная - вода (4:1:1) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают, сушат на воздухе и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО рутина должна обнаруживаться зона адсорбции коричнево-зеленого или серо зеленого цвета.

На хроматограмме настойки должны обнаруживаться зоны адсорбции (по возрастанию): серого цвета, коричневато-зеленого цвета на уровне зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО рутина, серого или коричневатого цвета, коричнево-зеленого цвета, серого или коричневатого, коричнево-зеленого, голубовато-серого или желтоватого цвета, серого цвета, красного цвета; допускается обнаружение других зон коричневато-зеленого или серого цвета.

Затем хроматограмму обрабатывают алюминия хлорида раствором 3 % в спирте 70 %, сушат при комнатной температуре и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО рутина должна обнаруживаться зона адсорбции желтого цвета.

На хроматограмме настойки должны обнаруживаться 4 зоны адсорбции желтого цвета, нижняя зона на уровне зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО рутина.

2. К 2 мл настойки прибавляют 0,2 мл железа(III) хлорида раствора 3 %; должно появиться черно-зеленое окрашивание (дубильные вещества).

3. К 1 мл настойки прибавляют 0,5 мл натрия гидроксида раствора 10 % должны наблюдаться хлопья коричневого цвета. К смеси прибавляют 0,5 мл пикриновой кислоты насыщенного раствора, нагревают в течение нескольких минут на кипящей водяной бане; должно появиться темно-красное окрашивание (восстанавливающие сахара).

4. К 1 мл настойки прибавляют 5 мл воды и интенсивно встряхивают; должна образоваться обильная устойчивая пена (сапонины).

Сухой остаток. Не менее 1,3 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,895 до 0,925 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в настойке должно быть не менее 0,2 %.

Приготовление растворов.

Приготовление раствора стандартного образца (СО) рутина. Около 0,05 г (точная навеска) СО рутина, высушенного до постоянной массы при 100 – 105 °С в течение 1,5 ч, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 20 мл спирта 70 %, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивают (раствор А СО рутина). Срок годности раствора 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

0,5 мл раствора А СО рутина помещаю мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 3 мл алюминия хлорида раствора 3 % в спирте 70 %, 1 каплю уксусной кислоты раствора 3 %, доводят объем растворов спиртом 70 % до метки и перемешивают (раствор Б СО рутина). Раствор используют свежеприготовленным.

Около 2,5 г (точная навеска) настойки помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят до метки спиртом 70 % и перемешивают (раствор А испытуемого раствора). В две мерные колбы вместимостью по

25 мл помещают по 1 мл раствор А испытуемого раствора; в первую колбу прибавляют 3 мл алюминия хлорида раствора 3 % в спирте 70 %, 1 каплю уксусной кислоты раствора 3 % (раствор Б испытуемого раствора), а во вторую - 1 каплю уксусной кислоты раствора 3 %, доводят объем растворов в обеих колбах спиртом 70 % до метки и перемешивают.

Через 40 мин измеряют оптическую плотность раствор Б испытуемого раствора в при длине волны 411 нм, в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор из второй колбы.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО рутина.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в настойке в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 25 \cdot 25 \cdot 0{,}5 \cdot 100 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot 1 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора.
A_0 – оптическая плотность раствора Б СО рутина.
a_0 – навеска СО рутина, г;
a – навеска настойки, г;
P – содержание основного вещества в СО рутина, %.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Пеония оффициналис **ФС.2.6.0039.18**

Пеония

Paeonia officinalis

Paeonia

Настойка гомеопатическая матричная **Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Пеония оффициналис (Пеония) - Paeonia officinalis (Paeonia) настойку гомеопатическую матричную, получаемую из свежих корневищ с корнями пиона лекарственного, собранных весной - *Paeonia officinalis* L., сем. пионовых - *Paeoniaceae* применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Для получения настойки необходимо:

Пиона лекарственного корневищ с корнями свежих - 100 г

Спирта этилового 86 % (м/м) или 90 % (о/о) - достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляется по способу 3 ОФС «Настойки гомеопатические матричные»

Описание

Прозрачная жидкость красновато-коричневого цвета, характерного ароматного запаха.

Подлинность

1. Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Приготовление раствора стандартного образца (СО) глюкозы. 0,1 г глюкозы растворяют в 10 мл спирта 70 % и перемешивают. Срок годности раствора 30 сут.

Приготовление раствора тимола. 0,5 г тимола растворяют в смеси, состоящей из 5 мл кислоты серной концентрированной и 95 мл спирта 96 %. Срок годности раствора 20 сут.

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 20 мкл настойки и 5 мкл раствора СО глюкозы. Пластинку сушат на воздухе, затем помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 40 мин смесью растворителей хлороформ - спирт 96 % - вода (38:37:5) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, обрабатывают раствором тимола, затем помещают в сушильный шкаф и выдерживают при температуре 100 – 105 °С в течение 8 – 10 мин и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО глюкозы должна обнаруживаться зона адсорбции темно-розового цвета в средней трети пластинки.

На хроматограмме настойки должны обнаруживаться зоны адсорбции (от линии старта): красно-коричневого цвета на уровне зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО глюкозы (часто растянутая почти до линии нанесения), выше бледно фиолетового цвета, красно-коричневого цвета, фиолетового цвета; допускается обнаружение зоны розового цвета над линией старта, желтоватого или бледно-фиолетового цвета и 3 зоны бледно-фиолетового цвета.

3. К 1 мл настойки прибавляют 0,2 мл железа(III) хлорида раствора 3 %; должно появиться сине-черное окрашивание. Осторожно, по стенке

прибавляют 2 мл серной кислоты концентрированной; граница раздела должна окраситься в темно-красновато-коричневый цвет, верхняя фаза – в желто-коричневый цвет (фенольные соединения).

4. К 1 мл настойки прибавляют 5 мл воды и 0,1 мл натрия гидроксида раствора 10 %; смесь должна окраситься в коричневый цвет. При интенсивном встряхивании; появляется устойчивая пена (сапонины).

5. К 1 мл настойки прибавляют 0,5 мл натрия гидроксида раствора 10 %, 0,5 мл пикриновой кислоты насыщенного раствора, нагревают в течение нескольких минут на кипящей водяной бане; должно появиться темно-красное окрашивание (восстанавливающие сахара).

Сухой остаток. Не менее 3 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,900 до 0,930 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание суммы фенольных соединений в пересчете на галловую кислоту в настойке должно быть не менее 0,15 %.

Приготовление растворов.

Приготовление раствора СО галловой кислоты. Около 0,015 г (точная навеска) галловой кислоты растворяют в 20 мл спирта 70 % в мерной колбе вместимостью 25 мл, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор А СО галловой кислоты). Срок годности раствора 30 сут.

0,5 мл раствора А СО галловой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора до метки буферным раствором с pH 9,0 и перемешивают (раствор Б СО галловой кислоты).

Приготовление буферного раствора с pH 9,0. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 900 мл натрия тетрабората раствора

0,05 М, прибавляют 100 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,1 М, перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Около 2,0 г (точная навеска) настойки помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят до метки спиртом 70 % и перемешивают. (раствор А испытуемого раствора). 1,0 мл раствора А испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят до метки буферным раствором с pH 9,0 и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора). Через 5 мин измеряют оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 277 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют буферный раствор с pH 9,0. Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО галловой кислоты.

Содержание суммы фенольных соединений в пересчете на галловую кислоту в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{a_0 \cdot 25 \cdot 25 \cdot 0{,}5 \cdot A \cdot 100 \cdot P}{a \cdot A_0 \cdot 25 \cdot 25 \cdot 1 \cdot 100},$$

где A_0 – оптическая плотность раствора Б СО галловой кислоты;
A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
a_0 – навеска СО галловой кислоты, г;
a – навеска настойки, г;
P – содержание основного вещества в СО галловой кислоты, %.

Допускается содержание суммы фенольных соединений в пересчете на галловую кислоту в процентах (X) вычислять с использованием удельного показателя поглощения по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 25 \cdot 25}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot \text{а} \cdot 1},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
a – навеска настойки, г;
$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения галловой кислоты равный 508.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Пеония оффициналис **ФС.2.6.0038.18**
Пеония (4)

Paeonia officinalis
Paeonia (4)

Настойка гомеопатическая матричная **Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Пеония оффициналис (Пеония) (4) - Paeonia officinalis (Paeonia) (4) настойку гомеопатическую матричную, получаемую из пиона лекарственного корневищ с корнями высушенных, собранных весной – *Paeonia officinalis* L., сем. пионовых – *Paeoniaceae* и применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Для получения настойки необходимо:

Пиона лекарственного корневищ с корнями высушенных - 100 г

Спирта этилового 62 % (м/м) или 70 % (о/о) - достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляется из измельченного сырья (0,71 мм) по способу 4 ОФС «Настойки гомеопатические матричные»

Описание

Прозрачная жидкость от желтого до темно-желтого цвета, с характерным ароматным запахом.

Подлинность

1. Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов

Приготовление раствора стандартного образца (СО) глюкозы. 0,1 г глюкозы растворяют в 10 мл спирта 70 % и перемешивают. Срок годности раствора 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Приготовление раствора тимола. 0,5 г тимола растворяют в смеси, состоящей из 5 мл серной кислоты концентрированной и 95 мл спирта 96 %. Срок годности раствора 20 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 20 мкл настойки и 5 мкл раствора СО глюкозы. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 40 мин смесью растворителей хлороформ - спирт 96 % - вода (38:37:5) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, обрабатывают раствором тимола, помещают в сушильный шкаф и выдерживают при температуре 100 – 105 °С в течение 8 – 10 мин.

На хроматограмме СО глюкозы должна обнаруживаться зона адсорбции темно-розового цвета в средней трети пластинки.

На хроматограмме настойки должны обнаруживаться зоны адсорбции: красно-коричневого цвета на уровне зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО глюкозы (часто растянутая почти до линии нанесения), выше бледно фиолетового цвета, красно-коричневого цвета, фиолетового цвета; допускается обнаружение зоны розового цвета над линией старта, желтоватого или бледно-фиолетового цвета и 3 зоны бледно-фиолетового цвета.

2. К 1,0 мл настойки прибавляют 0,2 мл железа(III) хлорида раствора 3 %; должно появиться сине-черное окрашивание. Осторожно, по стенке

прибавляют 2 мл серной кислоты концентрированной; граница раздела должна окраситься в темно-красновато-коричневый цвет, верхняя фаза – в желто-коричневый цвет (фенольные соединения).

3. К 1 мл настойки прибавляют 5 мл воды и 0,1 мл натрия гидроксида раствора 10 %; смесь должна окраситься в коричневый цвет. При интенсивном встряхивании появляется устойчивая пена (сапонины).

4. К 1 мл настойки прибавляют 0,5 мл натрия гидроксида раствора 10 %, 0,5 мл пикриновой кислоты раствора насыщенного, нагревают в течение нескольких минут на кипящей водяной бане; должно появиться темно-красное окрашивание (восстанавливающие сахара).

Сухой остаток. Не менее 2,5 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,890 до 0,910 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание суммы фенольных соединений в пересчете на галловую кислоту в настойке должно быть не менее 0,08 %.

Приготовление растворов

Приготовление раствора СО галловой кислоты. Около 0,015 г (точная навеска) СО галловой кислоты растворяют в 20 мл спирта 70 % в мерной колбе вместимостью 25 мл, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают. (раствор А СО галловой кислоты). Срок годности раствора 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

0,5 мл раствора А СО галловой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора до метки буферным раствором с pH 9,0 и перемешивают (раствор Б СО галловой кислоты). Раствор используют свежеприготовленным.

Приготовление буферного раствора с pH 9,0. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 900 мл натрия тетрабората раствора 0,05 М, прибавляют 100 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,1 М, перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Около 2,0 г (точная навеска) настойки помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят до метки спиртом 70 % и перемешивают (раствор А испытуемого раствора). 2,0 мл раствора А испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят до метки буферным раствором с pH 9,0 и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора). Через 5 мин измеряют оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 277 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют буферный раствор с pH 9,0.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО галловой кислоты.

Содержание веществ фенольного характера в пересчете на галловую кислоту в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{a_0 \cdot 25 \cdot 25 \cdot 0{,}5 \cdot A \cdot 100 \cdot P}{a \cdot A_0 \cdot 25 \cdot 25 \cdot 2 \cdot 100}$$

где A_0 – оптическая плотность раствора Б СО галловой кислоты;
A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
a_0 – навеска СО галловой кислоты г;
a – навеска настойки в г;
P – содержание основного вещества в СО галловой кислоты, %.

Допускается содержание суммы фенольных соединений в пересчете на галловую кислоту в процентах (X) вычислять с использованием удельного показателя поглощения по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 25 \cdot 25}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 2}$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора,
a – навеска настойки, г,
$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения галловой кислоты равный 508.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Пульсатилла пратенсис	**ФС.2.6.0040.18**
Pulsatilla pratensis	
Настойка гомеопатическая матричная	**Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Пульсатилла пратенсис - Pulsatilla pratensis настойку гомеопатическую матричную, получаемую из свежей травы прострела лугового – *Pulsatillae pratensis* (L.) Mill, сем. лютиковых – *Ranunculaceae,* и применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Для получения настойки необходимо:

Прострела лугового травы свежей	- 100 г
Спирта этилового 86 % (м/м) или 90 % (о/о)	- достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляется по способу 3 ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Описание

Жидкость желто-коричневого цвета, со слабым характерным запахом.

Подлинность

1. Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов

Приготовление нингидрина раствора 1 % в ацетоне. 1,0 г нингидрина растворяют в 100 мл ацетона. Срок годности раствора 60 сут.

Приготовление ванилина раствора 0,35 % в серной кислоте. 0,16 г ванилина растворяют в смеси из 16 мл воды очищенной и 30 мл серной кислоты концентрированной. Раствор используется свежеприготовленным.

А. На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 10 мкл настойки. Пластинку сушат на воздухе в течение 15 мин и помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин смесью растворителей ацетон – гексан (1:2) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат на воздухе в течение 5 мин, затем пластинку обрабатывают ванилина раствором 0,35 % в серной кислоте и выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100 – 105 °С в течение 5 мин.

На хроматограмме испытуемой настойки должны обнаруживаться три зоны адсорбции ярко-желто-коричневого или коричнево-фиолетового цвета (терпеноиды).

Б. На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 10 мкл настойки. Пластинку сушат на воздухе в течение 15 мин и помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин смесью растворителей бутанол – уксусная кислота ледяная - вода (4:1:5), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат на воздухе в течение 5 мин, затем пластинку обрабатывают нингидрина раствором 1 % в ацетоне и выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100 – 105 °С в течение 5 мин.

На хроматограмме испытуемой настойки должны обнаруживаться не менее 5 зон адсорбции розового или фиолетового цвета (аминокислоты).

2. К 0,5 мл настойки прибавляют 10 мл воды и интенсивно встряхивают, образуется устойчивая пена (сапонины).

Сухой остаток. Не менее 0,4 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,978 до 0,982 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание дубильных веществ в пересчете на танин в настойке должно быть не менее 10 %.

Проводят определение дубильных веществ в пересчете на танин. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1, навеска настойки 20,0 г).

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Хранить с осторожностью.

Рододендрон ауреум **ФС.2.6.0041.18**
Рододендрон

Rhododendron aureum
Rhododendron

Настойка гомеопатическая матричная **Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Рододендрон ауреум (Рододендрон) - Rhododendron aureum (Rhododendron) настойку гомеопатическую матричную, получаемую из собранных во время цветения свежих побегов рододендрона золотистого – *Rhododendron aureum* Georgi *(Rhododendron chrysantum* Pall*.),* сем. вересковых – *Ericaceae,* и применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Для получения настойки необходимо:

Рододендрона золотистого побегов свежих - 100 г

Спирта этилового 62 % (м/м) или 70 % (о/о) - достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляют по способу 2а ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Описание

Жидкость коричневого цвета, с характерным запахом

Подлинность

1. Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) арбутина. 0,05 г СО арбутина растворяют в 100 мл спирта 70 % и перемешивают. Срок годности раствора 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор стандартного образца (СО) рутина. 0,05 г СО рутина растворяют в 100 мл спирта 70 % и перемешивают. Срок годности раствора 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор стандартного образца (СО) галловой кислоты. 0,05 г СО галловой кислоты, растворяют в 100 мл спирта 70 % и перемешивают. Срок годности раствора 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор стандартного образца (СО) гиперозида 0,05 г СО гиперозида растворяют в 100 мл спирта 70 % и перемешивают.

Фосфорномолибденовой кислоты спиртовой раствор 20 %. 5,0 г фосфорномолибденовой кислоты растворяют в 25 мл спирта 90 % и перемешивают. Срок годности раствора 2 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 20 мкл настойки и по 10 мкл растворов СО арбутина, СО рутина, СО галловой кислоты и СО гиперозида. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе в течение 2 - 3 мин и помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 1 ч смесью растворителей этилацетат – хлороформ - уксусная кислота ледяная (15:8:3:2), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат на воздухе до удаления следов растворителей и обрабатывают фосфорномолибденовой кислоты спиртовым раствором 20 %, затем помещают в сушильный шкаф и выдерживают при температуре 100 – 105 °С в течение 10 мин, затем просматривают при дневном свете.

На хроматограммах растворов СО обнаруживаются зоны, в средней трети пластинки темно-желтого цвета (гиперозид); выше зоны оранжевого цвета (арбутин); красного цвета (рутин) и красного цвета (кислота галловая).

На хроматограмме настойки должны обнаруживаться зоны адсорбции на уровне зон на хроматограммах СО гиперозида, СО арбутина, СО рутина и

СО галловой кислоты. Допускается обнаружение дополнительных зон.

2. К 1 мл настойки прибавляют 5 мл воды и 1 мл железа(III) хлорида раствора 5 %, должно наблюдается темно-зелёное окрашивание (дубильные вещества).

3. 1,5 мл настойки помещают в выпарительную чашку и выпаривают на кипящей водяной бане досуха. Сухой остаток растворяют в 2 мл воды. Полученный раствор пропускают через колонку размером 0,5 × 2 см, заполненную алюминия оксидом нейтральным. К фильтрату прибавляют 0,1 мл натрия карбоната раствора 2 % 0,2 мл 2,6-дихлорхинонхлоримида раствора 1 %. Наблюдается синее окрашивание (арбутин).

4. К 1 мл настойки прибавляют 2 мл реактива Фелинга и нагревают до кипения. Выпадает кирпично-красный осадок (восстанавливающие сахара).

Сухой остаток. Не менее 0,28 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,890 до 0,910 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание суммы фенольных соединений в пересчете на галловую кислоту в настойке должно быть не менее 0,80 %.

Приготовление растворов.

Раствор СО галловой кислоты. Около 0,05 г (точная навеска) галловой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл

спирта 50 % и перемешивают до растворения, затем доводят объём раствора спиртом 50 % до метки и перемешивают (раствор А СО галловой кислоты). Срок годности раствор 30 сут при хранении в защищенном от света месте.

2,0 мл раствора А СО галловой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем раствора спиртом 50 % до метки, перемешивают (раствор Б СО галловой кислоты). Раствор используют свежеприготовленным.

Около 5,0 г (точная навеска) настойки помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл и доводят объем раствора спиртом 70 % до метки (раствор А испытуемого раствора). 2,5 мл раствора А испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора спиртом 70 % до метки (раствор Б испытуемого раствора). 10 мл раствора Б испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем раствора спиртом 70 % до метки (раствор В испытуемого раствора).

Оптическую плотность полученного раствора В испытуемого раствора измеряют на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 269 нм. Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО галловой кислоты. В качестве растворов сравнения в обоих случаях используют спирт 70 %.

Содержание суммы фенольных соединений в пересчете на галловую кислоту в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 2 \cdot 250 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100 \cdot P}{A_0 \cdot 100 \cdot 100 \cdot a \cdot 2{,}5 \cdot 10 \cdot 100},$$

где, A – оптическая плотность раствор В испытуемого раствора,
A_o – оптическая плотность раствор Б СО галловой кислоты;
a_o – навеска СО галловой кислоты, г;
a – навеска настойки, г;
P – содержание основного вещества в СО галловой кислоты, %.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Рута гравеоленс **ФС.2.6.0042.18**

Рута

Ruta graveolens

Ruta

Настойка гомеопатическая матричная **Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяются на Рута гравеоленс (Рута) - Ruta graveolens (Ruta) настойку гомеопатическую матричную, получаемую из свежей травы руты душистой – *Ruta graveolens* L. сем. рутовых – *Rutaceae*, собранной в начале цветения, и применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Для получения настойки необходимо:

Руты душистой травы свежей - 100 г

Спирта этилового 86 % (м/м) или 90 % (о/о) - достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляется по способу 3 ОФС «Настойки гомеопатические матричные»

Описание

Жидкость от коричневого до зелено-коричневого цвета, сильного характерного ароматного запаха.

Подлинность

1. Тонкослойная хроматография

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 20 мкл настойки 5 мкл раствора стандартного образца (СО) рутина (см. «Количественное определение») Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 40 мин смесью растворителей этилацетат - спирт 96 % - вода - уксусная ледяная кислота (10:6:2:2), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают, сушат до удаления следов растворителей и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

В УФ-свете на хроматограмме раствора СО рутина должна обнаруживаться зона адсорбции коричнево-зеленого или серо-зеленого цвета.

На хроматограмме настойки должны обнаруживаться зоны адсорбции с (по возрастанию): с желтовато-белой флуоресценцией, с беловатой флуоресценцией, серого цвета, серого цвета, коричнево-зеленого цвета на уровне зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО рутина, с фиолетовой флуоресценцией, с голубой флуоресценцией, с фиолетовой флуоресценцией; допускается обнаружение других зон коричневатого или серого цвета.

Пластинку обрабатывают свежеприготовленным диазореактивом, помещают в сушильный шкаф и выдерживают при температуре 110 °С в течение 5 мин и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме настойки должны обнаруживаться 2 зоны адсорбции оранжевого цвета на уровне зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО рутина; допускается обнаружение других зон адсорбции.

2. К 2 мл настойки прибавляют 0,2 мл раствора железа(III) хлорида; должно появиться черно-зеленое окрашивание (дубильные вещества).

3. К 1 мл настойки прибавляют 1 мл раствора натрия гидроксида 10 %, 0,5 мл пикриновой кислоты насыщенного раствора, нагревают в

течение нескольких минут на кипящей водяной бане; должно появиться темно-красное окрашивание (восстанавливающие сахара).

Сухой остаток. Не менее 2,5 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,900 до 0,930 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в настойке должно быть не менее 0,1 %.

Приготовление растворов

Приготовление раствора СО рутина. Около 0,05 г (точная навеска) СО рутина предварительно высушенного при температуре 100 – 105 °С в течение 1,5 ч, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 20 мл спирта 70 %, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки, перемешивают (раствор А СО рутина). Срок годности раствора 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 0,5 мл раствора А СО рутина, 3 мл алюминия хлорида раствора 3 % в спирте 70 %, 1 каплю уксусной кислоты раствора 3 % и доводят до метки спиртом 70 % (раствор Б СО рутина).

Около 3,0 г (точная навеска) настойки помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят до метки спиртом 70 % и перемешивают (испытуемый раствор А). В две мерные колбы вместимостью по 25 мл помещают по 2,0 мл испытуемого раствора А; в первую колбу прибавляют 3 мл алюминия хлорида раствора 3 % в спирте 70 %, 1 каплю уксусной кислоты раствора 3 % (испытуемый раствор Б), а во вторую 1 каплю уксусной кислоты раствора 3 %, доводят объем растворов в обеих колбах спиртом 70 % до метки и перемешивают.

Через 40 мин измеряют оптическую плотность испытуемого раствора Б на спектрофотометре при длине волны 412 нм, в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор из второй колбы.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО рутина. В качестве раствора сравнения используют раствор, полученный из 2 мл раствора А СО рутина, 1 капли уксусной кислоты раствора 3 %и доведенный до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл спиртом 70 %.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в настойке в % (X, %) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 25 \cdot 25 \cdot 0{,}5 \cdot P \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 2 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора Б;
A_0 – оптическая плотность раствора Б СО рутина;
a_0 – навеска СО рутина, г;
a – навеска настойки, г;
P – содержание основного вещества в СО рутина, %.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Самбукус нигра **ФС.2.6.0043.18**
Самбукус

Sambucus nigra
Sambucus

Настойка гомеопатическая матричная **Взамен ФС 42-0118-03**

Настоящая фармакопейная статья распространяются на Самбукус нигра (Самбукус) - Sambucus nigra (Sambucus) настойку гомеопатическую матричную, получаемую из свежих листьев и цветков растения бузина черная *Sambucus nigra* L., сем. жимолостных - *Caprifoliaceae,* и применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Для получения настойки необходимо:

Бузины черной листьев и цветков свежих (равные части)	- 100 г
Спирта этилового 86 % (м/м) или 90 % (о/о)	- достаточное количество для получения настойки

Примечание
Получение настойки гомеопатической матричной осуществляют по способу 3 «Настойки гомеопатические матричные».

Описание. Прозрачная жидкость коричневато-зеленого цвета, с характерным запахом.

Подлинность

1. Тонкослойная хроматография.

Приготовление растворов.
Раствор сравнения. 0,05 г СО резорцина и 0,05 г СО тимола

растворяют в 50 мл метанола и перемешивают. Срок годности 1 мес.

Раствор стандартного образца (СО) рутина. Около 0,025 г СО рутина растворяют в 50 мл спирта 96 %. Срок годности 1 мес.

А. На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят раздельно полосами длиной 10 мм 60 мкл настойки и 10 мкл раствора сравнения. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 1 ч смесью растворителей этилацетат – муравьиная кислота – вода (80:10:10), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и опрыскивают анисового альдегида раствором спиртовым сернокислым, выдерживают при температуре около 110 °С в течение 10 мин и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора сравнения должны обнаруживаться зоны адсорбции красного цвета: резорцина в средней трети пластинки, и тимола выше зоны резорцина.

На хроматограмме настойки должны обнаруживаться две зоны адсорбции ниже зоны адсорбции резорцина: серо-фиолетового цвета (снизу) и желтого цвета (над ней), затем две зоны адсорбции выше зоны адсорбции резорцина – фиолетового цвета. Зона адсорбции тимола на хроматограмме раствора сравнения расположена выше всех зон адсорбции на хроматограмме настойки.

Б. На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 20 мкл настойки и рядом 10 мкл раствора СО рутина. Пластинку с нанесенными пробами помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 1 ч смесью растворителей: этилацетат – муравьиная кислота – вода (80:10:10) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры и сушат до удаления следов растворителей, после чего просматривают в УФ-свете при

длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО рутина должна обнаруживаться зона адсорбции коричневого цвета в нижней трети пластинки.

На хроматограмме настойки должны обнаруживаться зоны адсорбции на уровне зоны адсорбции рутина коричневого цвета и две зоны с флюоресценцией голубого цвета выше зоны адсорбции рутина.

Затем пластинку обрабатывают алюминия хлорида раствором 2 %, выдерживают в сушильном шкафу при температуре около 110 °С в течение 5 мин и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

В УФ-свете на хроматограмме раствора СО рутина должна обнаруживаться зона адсорбции с флюоресценцией зеленовато-желтого цвета.

В УФ-свете на хроматограмме настойки должна обнаруживаться зона с флюоресценцией зеленовато-желтого цвета на уровне зоны адсорбции СО рутина и две зоны адсорбции с флюоресценцией голубого цвета выше зоны адсорбции рутина.

2. К 1 мл настойки прибавляют 0,1 мл железа (III) хлорида раствора 3 %; должно наблюдаться темно-зеленое окрашивание (дубильные вещества).

3. К 1 мл настойки прибавляют 0,1 мл натрия гидроксида раствора 10 % и 0,1 мл пикриновой кислоты раствора 1 %, нагревают на водяной бане; должно наблюдаться красное окрашивание (самбунигрин).

Сухой остаток. Не менее 1,7 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,900 до 0,920 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание **с**уммы флавоноидов в пересчете на рутин в настойке должно быть не менее 0,2 %.

Приготовление растворов.

Раствор СО рутина. Около 0,05 г (точная навеска) СО рутина, высушенного в течение 3 ч при температуре 130 – 135 °С, растворяют при нагревании в спирте 70 % в мерной колбе вместимостью 50 мл. После охлаждения до комнатной температуры доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивают (раствор А СО рутина). Срок годности раствора 30 сут при хранении в прохладном защищенном от света месте.

1 мл раствора А СО рутина, 10 мл спирта 96 %, 0,5 мл уксусной кислоты раствора 30 %, 3 мл алюминия хлорида раствора 5 %, помещенных в мерную колбу вместимостью 25 мл и доведенных спиртом 96 % до метки (раствор Б СО рутина). Срок годности раствора 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около 1,0 г (точная навеска) настойки помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивают (раствор А испытуемого раствора).

5,0 мл раствора А испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 10 мл спирта 96 %, 0,5 мл уксусной кислоты раствора 30 %, 3 мл алюминия хлорида раствора 5 %, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и тщательно перемешивают (раствор Б испытуемого раствора).

Оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора измеряют через 30 мин на спектрофотометре при длине волны 408 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 5 мл раствора А испытуемого раствора, 10 мл спирта 96 %, 0,5 мл уксусной кислоты раствора 30 %, доведенный спиртом 70 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО рутина. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл раствора А СО рутина, 10 мл спирта 96 %, 0,5 мл уксусной кислоты раствора 30 %, доведенный спиртом 70 % до метки в мерной колбе вместимостью

25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в настойке в процентах в (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 25 \cdot 25 \cdot 1 \cdot P \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 5 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100} \cdot 100 = \frac{A \cdot a_0 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot 10},$$

где *A* – оптическая плотность раствор Б испытуемого раствора;
$A_о$ – оптическая плотность раствора Б СО рутина;
a – навеска настойки, г;
$a_о$ – навеска СО рутина, г;
P – содержание основного вещества в СО рутина, %.

Допускается содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в процентах в (*X*) вычислять с использованием удельного показателя поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 25 \cdot 25}{A_{1см}^{1\%} \cdot a \cdot 5} = \frac{A \cdot 125}{A_{1см}^{1\%} \cdot a},$$

где *A* – оптическая плотность раствор Б испытуемого раствора;
$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при длине волны 408 нм, равный 248;
a – навеска настойки, г.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Стрихнос игнации **ФС.2.6.0044.18**
Игнация

Strychnos ignatii
Ignatia

Настойка гомеопатическая матричная **Взамен ФС 42-0130-04**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Стрихнос игнации (Игнация) - Strychnos ignatii (Ignatia) настойку гомеопатическую матричную, получаемую из высушенных зрелых семян Чилибухи игнация – *Strychnos ignatii* Bergius, сем. логаниевых – *Loganiaceae*, и применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Для получения настойки необходимо:

Чилибухи игнация семян зрелых высушенных - 100 г

Спирта этилового 62 % (м/м) или 70 % (о/о) - достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляется по способу 4 ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Описание

Жидкость желтого цвета, со слабым характерным запахом спирта.

Подлинность

1.Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов

Приготовление раствора стандартного образца (СО) стрихнина нитрата. Около 0,010 г СО стрихнина нитрата растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором наносят по 10 мкл настойки и раствора СО стрихнина нитрата. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру со смесью растворителей: хлороформ – ацетон – диэтиламин (50:40:10), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм.

На хроматограмме раствора СО стрихнина нитрата в средней части хроматографической пластинки должна обнаруживаться зона адсорбции с флюоресценцией сине-зеленого цвета.

На хроматограмме настойки должны обнаруживаться не менее двух зон адсорбции – одна ниже и одна на уровне зоны адсорбции стрихнина нитрата (верхняя зона более интенсивная).

Затем пластинку опрыскивают модифицированным реактивом Драгендорфа и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме настойки должны обнаруживаться зоны адсорбции красно-оранжевого цвета.

2. 1 мл настойки помещают в фарфоровую чашку, прибавляют 0,1 мл серной кислоты разведенной 16 % и выпаривают на кипящей водяной бане досуха; на границе жидкости должно наблюдаться окрашивание фиолетового цвета (бруцин).

3. 2 мл настойки помещают в делительную воронку, прибавляют 0,2 мл аммиака раствора 10 %, 2 мл хлороформа и взбалтывают в течение 3 мин. Спирто-хлороформное извлечение фильтруют через бумажный фильтр с 0,1 г натрия сульфата безводного и выпаривают на кипящей водяной бане досуха. К сухому остатку прибавляют 0,1 мл раствора калия дихромата раствора 5 % и по каплям 0,1 мл серной кислоты концентрированной; должно наблюдаться быстро исчезающее окрашивание красно-фиолетового цвета (стрихнин).

Сухой остаток. Не менее 1,5 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,890 до 0,904 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание суммы алкалоидов (стрихнина и бруцина) в настойке должно быть не менее 0,20 % и не более 0,40 %, из которой стрихнина должно быть не менее 55 %.

Около 2,0 г (точная навеска) настойки помещают в фарфоровую чашку, прибавляют 5 мл серной кислоты раствора 0,05 М и выпаривают на кипящей водяной бане до 2 - 3 мл. Остаток количественно переносят с помощью 10 мл воды в делительную воронку вместимостью 50 мл, прибавляют 0,2 мл раствора аммиака концентрированного, 20,0 мл хлороформа и встряхивают в течение 3 мин. Хлороформное извлечение фильтруют через бумажный фильтр, содержащий 1,0 г натрия сульфата безводного, предварительно смоченного хлороформом, в круглодонную колбу вместимостью 100 мл. Извлечение хлороформом повторяют аналогично ещё 2 раза, используя каждый раз по 10 мл, взбалтывая в течение 3 мин. Хлороформные извлечения последовательно фильтруют через тот же фильтр в ту же колбу, прибавляют 10 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,1 М и отгоняют хлороформ на роторном испарителе. Раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 200 мл и доводят хлористоводородной кислоты раствором 0,1 М до метки (испытуемый раствор).

Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора при двух длинах волн 264 нм и 300 нм в кювете с толщиной слоя 1 см. В качестве раствора сравнения используют хлористоводородной кислоты раствор 0,1 М.

Содержание стрихнина ($X_{стр}$) и бруцина ($X_{бр}$) в процентах в настойке вычисляют с использованием удельных показателей поглощения по формулам:

$$X_{\text{стр}} = \frac{(A^{1\%}_{1см_{\text{бр}/300}} \cdot A_{264} - A^{1\%}_{1см_{\text{бр}/264}} \cdot A_{300}) \cdot 200}{(A^{1\%}_{1см_{\text{бр}/300}} \cdot A^{1\%}_{1см_{\text{стр}/264}} - A^{1\%}_{1см_{\text{бр}/264}} \cdot A^{1\%}_{1см_{\text{стр}/300}}) \cdot a} =$$

$$= \frac{0{,}6959 \cdot A_{264} - 1{,}012 \cdot A_{300}}{a}$$

$$X_{\text{бр}} = \frac{(A^{1\%}_{1см_{\text{стр}/264}} \cdot A_{300} - A^{1\%}_{1см_{\text{стр}/300}} \cdot A_{264}) \cdot 200}{(A^{1\%}_{1см_{\text{бр}/300}} \cdot A^{1\%}_{1см_{\text{стр}/264}} - A^{1\%}_{1см_{\text{бр}/264}} \cdot A^{1\%}_{1см_{\text{стр}/300}}) \cdot a} =$$

$$= \frac{1{,}006 \cdot A_{300} - 0{,}0268 \cdot A_{264}}{a}$$

где: A_{300} – оптическая плотность испытуемого раствора при длине волны 300 нм;

A_{264} – оптическая плотность испытуемого раствора при длине волны 264 нм;

$A^{1\%}_{1см_{\text{стр}/300}}$ - удельный показатель поглощения стрихнина в хлористоводородной кислоты растворе 0,1 М при длине волны 300 нм, равный 8;

$A^{1\%}_{1см_{\text{бр}/300}}$ - удельный показатель поглощения бруцина в хлористоводородной кислоты растворе 0,1 М при длине волны 300 нм, равный 207;

$A^{1\%}_{1см_{\text{стр}/264}}$- удельный показатель поглощения стрихнина в хлористоводородной кислоты растворе 0,1 М при длине волны 264 нм, равный 299;

$A^{1\%}_{1см_{\text{бр}/264}}$- удельный показатель поглощения бруцина в хлористоводородной кислоты растворе 0,1 М при длине волны 264 нм, равный 301;

а – навеска настойки, г

Испытание четвертого десятичного разведения (D 4)

Настойка гомеопатическая матричная соответствует первому десятичному разведению D1.

Измеряют оптическую плотность разведения D4 при длине волны 257 нм по отношению к этанолу 43 % (по массе). Оптическая плотность разведения D4 должна быть не более 0,30.

Методика приготовления разведения D4 описана в ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Хранить с осторожностью.

Стрихнос нукс-вомика **ФС.2.6.0045.18**
Нукс вомика

Strychnos nux-vomica
Nux vomica

Настойка гомеопатическая матричная **Взамен ФС 42-0129-04**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Стрихнос нукс-вомика (Нукс вомика) - Strychnos nux-vomica (Nux vomica) настойку гомеопатическую матричную, получаемую из высушенных зрелых семян чилибухи рвотной – *Strychnos nux-vomica* L., сем. логаниевых – *Loganiaceae,* и применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Для получения настойки необходимо:

Чилибухи рвотной зрелых высушенных измельченных семян (0,71 мм)	- 100 г
Спирта этилового 62 % (м/м) или 70 % (о/о)	- достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляется по способу 4 ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Описание

Жидкость от желтого до светло-коричневого цвета, со слабым характерным запахом спирта.

Подлинность

1.Тонкослойная хроматография.

Приготовление растворов

Приготовление раствора стандартного образца (СО) стрихнина нитрата. Около 0,010 г СО стрихнина нитрата растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором наносят по 10 мкл настойки и раствора СО стрихнина нитрата. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру со смесью растворителей: хлороформ – ацетон – диэтиламин (50:40:10), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм.

На хроматограмме раствора СО стрихнина нитрата в средней части пластинки должна обнаруживаться зона адсорбции с флюоресценцией сине-зеленого цвета.

На хроматограмме настойки должны обнаруживаться две зоны адсорбции ниже и на уровне зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО стрихнина нитрата с флюоресценцией сине-зеленого цвета (с равной интенсивностью).

Затем пластинку обрабатывают модифицированным реактивом Драгендорфа и просматривают при дневном свете. На хроматограмме раствора СО стрихнина нитрата в средней части пластинки должна обнаруживаться зона адсорбции красно-оранжевого цвета.

На хроматограмме настойки должны обнаруживаться две зоны адсорбции красно-оранжевого цвета ниже и на уровне зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО стрихнина нитрата.

2. 1 мл настойки помещают в фарфоровую чашку, прибавляют 0,1 мл серной кислоты разведенной 16 % и выпаривают на кипящей водяной бане досуха; на границе жидкости должно наблюдаться фиолетовое окрашивание (бруцин).

3. 2 мл настойки помещают в делительную воронку, прибавляют 0,2 мл аммиака раствора 10 %, 2 мл хлороформа и взбалтывают в течение 3 мин. Спирто-хлороформное извлечение фильтруют через бумажный фильтр, содержащий 0,1 г натрия сульфата безводного, и выпаривают на кипящей водяной бане досуха. К сухому остатку прибавляют 0,1 мл калия дихромата раствора 5 % и по каплям 0,1 мл серной кислоты концентрированной; должно наблюдаться быстро исчезающее окрашивание красно-фиолетового цвета (стрихнин).

Сухой остаток. Не менее 1,0 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,888 до 0,903 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание суммы алкалоидов (стрихнина и бруцина) в настойке должно быть не менее 0,20 % и не более 0,30 %, из которой стрихнина должно быть от 43 % до 55 %.

Около 2,0 г (точная навеска) настойки помещают в фарфоровую чашку, прибавляют 5 мл серной кислоты раствора 0,05 М и выпаривают на кипящей

водяной бане до 2 - 3 мл. Остаток количественно переносят с помощью 10 мл воды в делительную воронку вместимостью 50 мл, прибавляют 0,2 мл раствора аммиака концентрированного, 20,0 мл хлороформа и встряхивают в течение 3 мин. Хлороформное извлечение фильтруют через бумажный фильтр, содержащий 1,0 г натрия сульфата безводного, предварительно смоченного хлороформом, в круглодонную колбу вместимостью 100 мл. Извлечение хлороформом повторяют аналогично ещё 2 раза, используя каждый раз по 10 мл, взбалтывая в течение 3 мин. Хлороформные извлечения последовательно фильтруют через тот же фильтр в ту же колбу, прибавляют 10 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,1 М и отгоняют хлороформ на роторном испарителе. Раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 200 мл и доводят хлористоводородной кислоты раствором 0,1 М до метки (испытуемый раствор).

Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора при двух длинах волн 264 нм и 300 нм в кювете с толщиной слоя 1 см. В качестве раствора сравнения используют хлористоводородной кислоты раствор 0,1 М.

Содержание стрихнина ($X_{стр}$) и бруцина ($X_{бр}$) в процентах в настойке вычисляют с использованием удельных показателей поглощения по формулам:

$$X_{\text{стр}} = \frac{(A^{1\%}_{1см\,\text{бр}/300} \cdot A_{264} - A^{1\%}_{1см\,\text{бр}/264} \cdot A_{300}) \cdot 200}{(A^{1\%}_{1см\,\text{бр}/300} \cdot A^{1\%}_{1см\,\text{стр}/264} - A^{1\%}_{1см\,\text{бр}/264} \cdot A^{1\%}_{1см\,\text{стр}/300}) \cdot a} =$$

$$= \frac{0{,}6959 \cdot A_{264} - 1{,}012 \cdot A_{300}}{a}$$

$$X_{\text{бр}} = \frac{(A^{1\%}_{1см\,\text{стр}/264} \cdot A_{300} - A^{1\%}_{1см\,\text{стр}/300} \cdot A_{264}) \cdot 200}{(A^{1\%}_{1см\,\text{бр}/300} \cdot A^{1\%}_{1см\,\text{стр}/264} - A^{1\%}_{1см\,\text{бр}/264} \cdot A^{1\%}_{1см\,\text{стр}/300}) \cdot a} =$$

$$= \frac{1{,}006 \cdot A_{300} - 0{,}0268 \cdot A_{264}}{a}$$

где: A_{300} – оптическая плотность испытуемого раствора при длине волны 300 нм;

A_{264} – оптическая плотность испытуемого раствора при длине волны 264 нм;

$A^{1\%}_{1см_{стр/300}}$ - удельный показатель поглощения стрихнина в хлористоводородной кислоты растворе 0,1 М при длине волны 300 нм, равный 8;

$A^{1\%}_{1см_{бр/300}}$ - удельный показатель поглощения бруцина в хлористоводородной кислоты растворе 0,1 М при длине волны 300 нм, равный 207;

$A^{1\%}_{1см_{стр/264}}$- удельный показатель поглощения стрихнина в хлористоводородной кислоты растворе 0,1 М при длине волны 264 нм, равный 299;

$A^{1\%}_{1см_{бр/264}}$- удельный показатель поглощения бруцина в хлористоводородной кислоты растворе 0,1 М при длине волны 264 нм, равный 301;

а – навеска настойки, г

Испытание четвертого десятичного разведения (D 4)

Матричная настойка соответствует первому десятичному разведению D1.

Измеряют оптическую плотность разведения D4 при длине волны 257 нм по отношению к этанолу 43 % (по массе). Оптическая плотность разведения D4 должна быть не более 0,20.

Методика приготовления разведения D4 описана в ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Хранить с осторожностью.

Токсикодендрон кверцифолиум **ФС.2.6.0046.18**

Рус токсикодендрон

Toxicodendron quercifolium

Rhus toxicodendron

Вводится впервые

Настойка гомеопатическая матричная

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Токсикодендрон кверцифолиум (Рус токсикодендрон) - Toxicodendron quercifolium (Rhus toxicodendron) настойку гомеопатическую матричную, получаемую из свежих молодых (еще не одревесневших) побегов, собранных весной от растения токсикодендрон дуболистный *Toxicodendron quercifolium* (Michx.) Greene (*Rhus toxicodendron L.),* сем. анакардиевых - *Anacardiaceae* и применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Для получения настойки необходимо

Токсикодендрона дуболистного молодых побегов свежих	- 100 г
Спирта этилового 86 % (м/м) или 90 % (о/о)	- достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляется по способу 2 ОФС «Настойки гомеопатические матричные и жидкие разведения».

Описание

Прозрачная жидкость красновато-коричневого цвета с характерным запахом.

Подлинность

1. ***Тонкослойная хроматография***

Приготовление растворов

Раствор стандартного образца (СО) галловой кислоты: 0,1 г галловой кислоты растворяют в 100 мл спирта 70 % и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 20 мкл настойки и 5 мкл СО галловой кислоты. Пластинку с нанесенными пробами помещают в камеру, предварительно насыщенную смесью растворителей хлороформ - уксусная кислота ледяная - метанол - вода (15:8:3:2) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и просматривают в УФ - свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме СО галловой кислоты в верхней трети пластинки должна обнаруживаться зона коричневого цвета.

На хроматограмме настойки должны обнаруживаться 3 зоны коричневого цвета, на уровне и ниже зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО галловой кислоты; зона красного цвета выше зоны СО галловой кислоты; дополнительно могут обнаруживаться зоны: коричневого цвета и зона серовато-голубого цвета в нижней трети пластинки.

2. К 1 мл настойки прибавляют 10 мл воды и 0,1 мл железа(III) хлорида раствора 10,5 %; должно наблюдаться черно–зеленое окрашивание (дубильные вещества).

3. К 1 мл настойки прибавляют 0,02 г порошка магния и 1 мл хлористоводородной кислоты концентрированной; должно наблюдаться красное окрашивание (флавоноиды).

Сухой остаток. Не менее 3,5 % и не более 6,0 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,940 до 0,960 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Испытание четвертого десятичного разведения (D4).

Приготовление растворов

1. Приготовление раствора соли прочного голубого В. 0,50 г прочного синего В, соли растворяют в 100 мл воды.

К 10,0 мл четвертого десятичного разведения D4 прибавляют 0,5 мл раствора соли прочного голубого В; должно наблюдаться образование окрашивания с интенсивностью, не превышающей интенсивность окрашивания смеси 1 мл желтого исходного раствора (ОФС «Степень окраски жидкостей), 0,5 мл красного исходного раствора (ОФС «Степень окраски жидкостей), и 8,5 мл воды.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Хранить с осторожностью.

Туя окциденталис **ФС.2.6.0047.18**
Туя

Thuja occidentalis
Thuja

Взамен ФС 42-0084-02

Настойка гомеопатическая матричная

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Туя окциденталис (Туя) - Thuja occidentalis (Thuja) настойку гомеопатическую матричную, получаемую из свежих олиственных побегов первого года жизни туи западной – *Thuja occidentalis* L., сем. кипарисовых – Cupressaceae, и применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных средств.

Для получения настойки необходимо:

Туи западной олиственных побегов свежих - 100 г

Спирта этилового 86 % (м/м) или 90 % (о/о) - достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляется по способу 3 ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Описание

Прозрачная жидкость зеленовато-коричневого цвета с характерным запахом.

Подлинность

1. Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) ментола. 0,010 г СО ментола растворяют в 10 мл спирта 96 %. Срок годности 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор СО лютеолина. 0,010 г СО лютеолина растворяют в 10 мл спирта 96 %. Срок годности 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

А. 2 мл настойки помещают в делительную воронку вместимостью 25 мл, прибавляют 2,0 мл воды, встряхивают, затем прибавляют 3,0 мл гексана и встряхивают в течение 3 мин. Гексановое извлечение переносят в круглодонную колбу. Проводят повторную экстракцию таким же количеством гексана. Извлечения объединяют и отгоняют досуха на роторном испарителе при температуре водяной бани 40 °С. Сухой остаток растворяют в 1,0 мл спирта 96 % (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят раздельно полосами длиной 10 мм 15,0 мкл испытуемого раствора и 20,0 мкл раствора СО ментола. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин смесью растворителей: этилацетат-бензол (70:30) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет 80 - 90 % длины пластинки от линии старта, хроматограмму вынимают из камеры, сушат на воздухе до удаления следов растворителей и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции с флюоресценцией голубого цвета в средней трети хроматографической пластинки.

Затем хроматограмму опрыскивают анисового альдегида раствором спиртовым в метаноле и выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100 - 105 °С в течение 1-2 мин и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО ментола должна обнаруживаться зона адсорбции розового цвета в средней трети пластинки.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться (в порядке возрастания) зона адсорбции розового цвета, две слабо выраженные

зоны розового цвета и три зоны адсорбции сиреневого цвета ниже уровня зоны адсорбции СО ментола.

Б. На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят раздельно полосами длиной 10 мм по 10 мкл настойки и 3 мкл раствора СО лютеолина. Пластинку сушат на воздухе, помещают в хроматографическую камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин смесью растворителей: хлороформ – спирт 96 % (40:10), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет 80 - 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат на воздухе до удаления следов растворителей и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме настойки должна обнаруживаться зона адсорбции с флюоресценцией голубого цвета между средней и верхней третью пластинки.

Затем пластинку опрыскивают алюминия хлорида спиртовым раствором 2 %, выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100-105 °С в течение 5 мин и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО лютеолина должна обнаруживаться зона адсорбции с флюоресценцией ярко-желтого цвета в средней трети пластинки.

На хроматограмме настойки должны обнаруживаться три зоны адсорбции с флюоресценцией желтого цвета ниже уровня зоны адсорбции СО лютеолина, одна – на уровне зоны адсорбции СО лютеолина (лютеолин), и одна зона с флюоресценцией голубого цвета выше зоны адсорбции СО лютеолина. Допускается обнаружение дополнительных зон адсорбции.

3. 0,5 мл настойки помещают в фарфоровую чашку, прибавляют 1 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, несколько кристаллов резорцина и нагревают на кипящей водяной бане в течение 2 мин; после

охлаждения должно наблюдаться коричневато-красное окрашивание (терпеноиды).

Сухой остаток. Не менее 2,2 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,890 до 0,910 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в настойке должно быть не менее 0,10 %.

Приготовление растворов

Раствор СО рутина. Около 0,05 г (точная навеска) СО рутина, предварительно высушенного при температуре 130 – 135 °С в течение 3 ч, растворяют в 85 мл спирта 96 % при перемешивании в мерной колбе вместимостью 100 мл при нагревании на водяной бане, охлаждают, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают. (раствор А СО рутина). Срок годности раствора не более 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

1 мл раствор А СО рутина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл алюминия хлорида раствора 2 %, 0,05 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б СО рутина).

1 мл настойки помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл алюминия хлорида раствора 2 %, 0,05 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (испытуемый раствор). Через 40 мин измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 406 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл настойки, 0,05 мл уксусной кислоты

разведенной 30 % и доведенный спиртом 96% до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО рутина в таких же условиях. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1,0 мл раствора А СО рутина, 0,05 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, доведенный спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в настойке в пересчете на рутин в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{\mathrm{A} \cdot \mathrm{a}_0 \cdot 25 \cdot 1 \cdot 100 \cdot \mathrm{P}}{\mathrm{A}_0 \cdot \mathrm{a} \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100} = \frac{A \cdot a_0 \cdot \mathrm{P}}{A_0 \cdot a \cdot 100},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;
$A_о$ – оптическая плотность раствора Б СО рутина;
$a_о$ – навеска СО рутина, г;
a – навеска настойки, г;
P – содержание основного вещества в СО рутина, %.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Фитолякка американа **ФС.2.6.0048.18**
Фитолякка

Phytolacca Americana
Phytolacca
Настойка гомеопатическая матричная **Взамен ФС 42-0156-05**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Фитолякка американа (Фитолякка) - Phytolacca Americana (Phytolacca) настойку гомеопатическую матричную, получаемую из собранных осенью свежих корней растения лаконоса американского - *Phytolacca americana* L., сем. лаконосовых – *Phytolaccaceae*, и применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных средств.

Для получения настойки необходимо:

Лаконоса американского корней свежих - 100 г

Спирта этилового 86 % (м/м) или 90 % (о/о) - достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляют по способу 3 ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Описание

Прозрачная жидкость от светло-желтого до желтого цвета без особого запаха.

Подлинность

1. Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов

Раствор стандартного образца (СО) олеаноловой кислоты. Около 0,008 г СО олеаноловой кислоты растворяют в 25 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят раздельно по 10 мкл испытуемой настойки и раствора СО олеаноловой кислоты полосами длиной 10 мм. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в хроматографическую камеру, предварительно насыщенную в течение 1 часа смесью: бутанол – спирт 96 % – аммиак (7:2:5) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 - 90 % от линии старта, ее вынимают, сушат на воздухе до удаления следов растворителей и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме испытуемой настойки должны обнаруживаться две основные зоны адсорбции с флюоресценцией светло-голубого цвета в нижней и средней трети пластинки; между этими зонами допускается наличие других зон адсорбции с флюоресценцией синего цвета (фенольные соединения).

Затем пластинку обрабатывают фосфорномолибденовой кислоты спиртовым раствором 10 % и выдерживают при температуре 100 - 105 °С в течение 5 мин.

На хроматограмме раствора СО олеаноловой кислоты при дневном свете в верхней трети пластинки должна обнаруживаться зона адсорбции синего цвета.

На хроматограмме настойки должно обнаруживаться не менее пяти зон адсорбции синего цвета ниже зоны адсорбции СО олеаноловой кислоты (сапонины).

2. К 1 мл настойки прибавляют 10 мл воды и сильно встряхивают; должна наблюдаться пена, устойчивая в течение нескольких часов (сапонины).

3. К 2 мл настойки, прибавляют 0,5 мл резорцина раствора и 1 мл кислоты хлористоводородной концентрированной; должно наблюдаться окрашивание красного цвета (свободные сахара).

4. 1 мл настойки помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, приливают 20 мл спирта 96 %, перемешивают, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают (испытуемый раствор). УФ-спектр испытуемого раствора в области длин волн от 200 до 340 нм должен иметь два максимума поглощения при длинах волн (214 ± 2) нм, (265 ± 2) нм и минимум при (245 ± 2) нм.

Сухой остаток. Не менее 1,8 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,883 до 0,915 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание суммы агликонов тритерпеновых сапонинов в пересчете на олеаноловую кислоту в настойке должно быть не менее 0,30 %.

Приготовление растворов

Раствор стандартного образца (СО) олеаноловой кислоты. Около 0,007 г (точная навеска) СО олеаноловой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 40 мл спирта 96 %, перемешивают до растворения, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор А СО олеаноловой кислоты). Срок годности 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

К 2 мл раствора А СО олеаноловой кислоты прибавляют 2 мл аммиачного буферного раствора (раствор Б СО олеаноловой кислоты). Раствор используют свежеприготовленным.

Около 22,5 г (точная навеска) настойки помещают в фарфоровую чашку и выпаривают на водяной бане досуха. Затем к сухому остатку прибавляют 7 мл хлористоводородной кислоты раствора 3 М, количественно переносят в колбу со шлифом вместимостью 100 мл и смывают остатки с фарфоровой чашки в ту же колбу 3 мл хлористоводородной кислоты раствора 3 М. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 3 часов. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры, содержимое переносят в делительную воронку, и последовательно экстрагируют по 15 мл этилацетата пятикратно. Этилацетатные фракции объединяют и промывают водой до нейтральной реакции среды, переносят в круглодонную колбу и отгоняют растворитель на роторном испарителе при температуре водяной бани 50 °С досуха. Сухой остаток растворяют в 10 мл спирта 96 %, переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, затем стенки круглодонной колбы ополаскивают ещё 10 мл спирта 96 %, которые переносят в ту же мерную колбу, доводят объем раствора этим же спиртом до метки и перемешивают (испытуемый раствор А).

1 мл испытуемого раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки, и

перемешивают. К 2 мл полученного раствора приливают 2 мл аммиачного буферного раствора и перемешивают (испытуемый раствор Б).

Через 5 мин измеряют оптическую плотность испытуемого раствора Б на спектрофотометре при длине волны 209 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют смесь, состоящую из спирта 96 % и аммиачного буферного раствора в соотношении 1:1.

Параллельно в тех же условиях измеряют оптическую плотность раствора Б СО олеаноловой кислоты, используя в качестве раствора сравнения ту же смесь, которую используют при регистрации оптической плотности испытуемого раствора Б.

Содержание суммы агликонов тритерпеновых сапонинов (*X*) в пересчете на олеаноловую кислоту в настойке вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 25 \cdot 25 \cdot 2 \cdot 4 \cdot 100 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot 50 \cdot 1 \cdot 2 \cdot 4 \cdot 1{,}166 \cdot 100} = \frac{A \cdot a_0 \cdot 25 \cdot P}{A_0 \cdot 2{,}332}$$

где: *A* – оптическая плотность испытуемого раствора Б;

Ao – оптическая плотность раствора Б СО олеаноловой кислоты;

a – навеска настойки, г;

ao – навеска СО олеаноловой кислоты, г;

1,166 – коэффициент пересчета фитолаккагенина на олеаноловую кислоту.

P – содержание основного вещества в СО олеаноловой кислоты, %.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Хранить с осторожностью.

Фукус везикулозус **ФС.2.6.0049.18**
Фукус

Fucus vesiculosus
Fucus

Настойка гомеопатическая матричная **Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Фукус везикулозус (Фукус) - Fucus vesiculosus (Fucus) настойку гомеопатическую матричную, получаемую из собранных в течение вегетационного периода свежих слоевищ фукуса пузырчатого – *Fucus vesiculosus* L., сем. фукусовых – *Fucaceae* и применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Для получения настойки необходимо:

Фукуса пузырчатого слоевищ свежих - 100 г

Спирта этилового 86 % (м/м) или 90 % (о/о) - достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляют по способу 3 ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Описание

Прозрачная жидкость зеленовато-коричневого цвета с характерным запахом.

Подлинность

1. Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Растворы стандартных образцов (СО) сахаров. По 0,005 г СО фруктозы, СО арабинозы, СО галактозы, СО глюкозы, СО рамнозы помещают в одну колбу и растворяют в 10 мл спирта 70 %, перемешивают. Срок годности раствора 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор тимола спиртовой 0,5 %. К 0,50 г тимола прибавляют 50 мл спирта 96 %, перемешивают до растворения, прибавляют 5 мл серной кислоты концентрированной, перемешивают, доводят объем раствора тем же спиртом до 100 мл. Срок годности раствора 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 25 мкл настойки и 5 мкл раствора СО сахаров. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе в течение 10 мин и помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин смесью растворителей вода – метанол – уксусная кислота ледяная – этиленхлорид (10:15:25:50) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат на воздухе при комнатной температуре до удаления следов растворителей. Затем обрабатывают тимола спиртовым раствором 0,5 %, нагревают в сушильном шкафу при температуре 100 – 105 °С до обнаружения окрашенных зон и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО сахаров должны обнаруживаться зоны адсорбции темно-серого цвета: по возрастанию галактоза, глюкоза, фруктоза, рамноза, арабиноза.

На хроматограмме испытуемой настойки должны обнаруживаться зоны адсорбции серого или коричневато-серого цвета на уровне зон на хроматограмме раствора СО сахаров; допускается обнаружение других окрашенных зон.

2. К 5 мл настойки прибавляют 5 мл реактива Фелинга и нагревают на кипящей водяной бане; должно наблюдаться образование кирпично-красного осадка (свободные сахара).

Сухой остаток. Не менее 0,40 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,832 до 0,835 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание суммы сахаров в пересчете на глюкозу в настойке должно быть не менее 5 %; йода должно быть не менее 0,15 %.

Сумма сахаров

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) глюкозы. Около 0,05 г (точная навеска) СО глюкозы помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл спирта 70 %, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и снова перемешивают (раствор А СО глюкозы). Срок годности раствора 30 сут.

1,5 мл раствора А СО глюкозы помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 2,5 мл пикриновой кислоты раствора 1 %, 7,5 мл натрия карбоната раствора 20 %, перемешивают доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают (раствор Б СО глюкозы) Раствор используют свежеприготовленным.

Около 10,0 г (точная навеска) настойки помещают в плоскодонную колбу вместимостью 50 мл, приливают 50 мл спирта 96 % и нагревают на кипящей водяной бане до выпадения хлопьевидного осадка. Через 1 ч содержимое колбы центрифугируют в течение 10 мин со скоростью 3000 об/мин. Осадок промывают 15 мл раствора спирта 50 % и сушат в

сушильном шкафу при температуре 100 – 105 °С. Сухой остаток из колбы количественно переносят в ампулу (или пробирку для гидролиза) и прибавляют 1 мл трифторуксусной кислоты раствора 10 %. Ампулу запаивают и выдерживают при температуре 100 – 105 °С в сушильном шкафу, в течение 3 час. Затем ампулу охлаждают, вскрывают, гидролизат центрифугируют и выпаривают с помощью роторного испарителя досуха. К сухому остатку прибавляют 20 мл спирта 96 % и вновь выпаривают досуха (до исчезновения запаха трифторуксусной кислоты). Полученный сухой остаток количественно переносят в стакан вместимостью 50 мл; колбу промывают 5 мл натрия гидроксида раствора 30 %, а затем еще четыре раза по 5 мл воды очищенной. Промывные воды присоединяют к основному раствору, который нейтрализуют до pH 6,5-7,0 по универсальному индикатору с помощью натрия гидроксида раствора 30 % или серной кислоты разведённой 9,8 %. Затем раствор переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, объем раствора доводят водой очищенной до метки, перемешивают и фильтруют через фильтр «белая лента» (раствор А испытуемого раствора).

В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 2,5 мл пикриновой кислоты раствора 1 %, приливают 7,5 мл натрия карбоната раствора 20 % и перемешивают, затем приливают 1,5 мл раствора А испытуемого раствора, погружают колбу в кипящую водяную баню на 10 мин, охлаждают, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора). Одновременно аналогично готовят раствор сравнения в мерной колбе вместимостью 50 мл, состоящий из 2,5 мл пикриновой кислоты раствора 1 % и 7,5 мл натрия карбоната раствора 20 %, доведенный водой очищенной до метки.

Измеряют оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 455 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО глюкозы. Содержание суммы сахаров в пересчете на глюкозу в процентах (X) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 50 \cdot 50 \cdot 100 \cdot 1{,}5 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot 1{,}5 \cdot 100 \cdot 50 \cdot 100},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
A_0 – оптическая плотность раствора Б СО глюкозы;
a_0 – навеска СО глюкозы, г;
a – навеска настойки, г;
P – содержание основного вещества в растворе СО глюкозы, %.

Йод

Около 10,0 г (точная навеска) настойки помещают в фарфоровый тигель, упаривают досуха на водяной бане, остаток в тигле смачивают 5-10 каплями натрия гидроксида раствора 30 % и осторожно обугливают на электрической плитке. Затем остаток прокаливают в муфельной печи при слабом калении (400-450 °С), периодически смачивая водой до появления черно-стального оттенка золы (т.е. до появления угля). Полученный уголь измельчают стеклянной палочкой в порошок, добавляют 10 мл горячей воды, затем перемешивают и фильтруют через бумажный складчатый фильтр «белая лента» в цилиндр вместимостью 100 мл. Остаток на фильтре промывают 5 раз горячей водой таким образом, чтобы общий объем фильтратов в цилиндре не превышал 60 мл. После охлаждения фильтрата объем жидкости в цилиндре доводят водой очищенной до 60 мл, прибавляют 10 мл хлороформа и 6-7 капель хлористоводородной кислоты разведенной 10 %. Смесь интенсивно взбалтывают в течение 2 мин, а затем титруют выделившийся йод 0,1 М раствором натрия тиосульфата до обесцвечивания хлороформного слоя. Параллельно проводят контрольный опыт, в котором вместо фильтрата угля используют воду очищенную и все остальные реактивы, как при титровании испытуемого раствора.

Содержание йода в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{V \cdot k \cdot T \cdot 100}{a},$$

где V – объем 0,1 М раствора натрия тиосульфата, мл;

k – поправочный коэффициент 0,1 М раствора натрия тиосульфата;

T – титр 1 мл 0,1 М раствора натрия тиосульфата соответствует 0,01269 г;

a – навеска настойки, г.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Хелидониум майус **ФС.2.6.0050.18**
Хелидониум

Chelidonium majus
Chelidonium

Настойка гомеопатическая матричная **Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Хелидониум майус (Хелидониум) - Chelidonium majus (Chelidonium) настойку гомеопатическую матричную, получаемую из свежих корневищ и корней растения чистотела большого – *Chelidonium majus* L., сем. маковых – *Papaveraceae,* применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Для получения настойки необходимо:

Чистотела большого корневищ и корней свежих	- 100 г
Спирта этилового 86 % (м/м) или 90 % (о/о)	- достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляют по способу 3 «Настойки гомеопатические матричные».

Описание. Жидкость от коричневато-желтого до коричневого цвета, характерного запаха.

Подлинность

1. Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов

Раствор стандартного образца (СО) сангвиритрина. Около 0,015 г СО сангвиритрина, растворяют в 10 мл спирта 96 %. Срок годности раствора 30 сут.

Раствор СО берберина сульфата. Около 0,015 г СО берберина сульфата, растворяют в 10 мл спирта 96 %. Срок годности раствора 30 сут.

Около 10 мл настойки помещают в делительную воронку вместимостью 50 мл, прибавляют 2 мл аммиака раствора концентрированного 32 %, 20 мл хлороформа и встряхивают в течение 10 мин. Экстракцию повторяют еще раз с таким же количеством хлороформа. Хлороформные извлечения отделяют и фильтруют через бумажный складчатый фильтр с 2,0 г натрия сульфата безводного в круглодонную колбу. Растворитель отгоняют с помощью роторного испарителя под вакуумом при нагревании на кипящей водяной бане досуха. Сухой остаток растворяют в 1,5 мл спирта 96 % (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором на полимерной подложке размером 10 × 15 см наносят 15 мкл испытуемого раствора и по 0,5 мкл раствора СО сангвиритрина и раствора СО берберина сульфата. Пластинку помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 40 мин смесью растворителей этилацетат – спирт 96 % – раствор натрия гидроксида 0,1 М (6:3:2) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат на воздухе при комнатной температуре до удаления следов растворителей и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО берберина сульфата в нижней трети пластинки должна обнаруживаться зона зеленовато-желтого цвета; на хроматограмме раствора СО сангвиритрина в верхней трети пластинки должна обнаруживаться основная зона адсорбции оранжевого цвета, также может обнаруживаться слабая зона желтого цвета в нижней трети пластинки.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться зоны по возрастанию от линии старта: зеленовато-желтого цвета на уровне зоны на хроматограмме СО берберина сульфата, выше зона желтого цвета, немного ниже зоны на хроматограмме СО сангвиритрина - зона оранжевого цвета, сразу под ней и над ней - зоны фиолетового цвета; допускается обнаружение других зон желтого и фиолетового цвета.

Затем пластинку обрабатывают модифицированным реактивом Драгендорфа и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО берберина сульфата должна обнаруживаться зона оранжевого цвета на желтом фоне; на хроматограмме раствора СО сангвиритрина должна обнаруживаться зона оранжевого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться основные зоны оранжевого цвета на уровне и выше зоны адсорбции на хроматограмме СО берберина сульфата; зона адсорбции на уровне СО сангвиритрина; допускается обнаружение других зон адсорбции оранжевого цвета.

2. На фильтровальную бумагу наносят пипеткой 0,05 мл испытуемой настойки, высушивают; в УФ-свете при длине волны 365 нм должна наблюдаться флуоресценция желтого цвета. В центр пятна наносят 0,05 мл натрия гидроксида раствора 8,5 %; в УФ-свете при длине волны 365 нм должна наблюдаться флуоресценция голубого цвета (алкалоиды).

Сухой остаток. Не менее 1,2 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,883 до 0,920 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Количественное определение. Содержание суммы алкалоидов в пересчете на сангвиритрин в настойке должно быть не менее 0,015 % и не более 0,07 %.

Приготовление раствора СО сангвиритрина. Около 0,020 г (точная навеска) СО сангвиритрина, высушенного до постоянной массы при температуре 100 – 105 °С, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 40 мл спирта 70 %, перемешивают до растворения при осторожном нагревании на водяной бане, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки, перемешивают (раствор А СО сангвиритрина).

1,0 мл раствора А сангвиритрина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, объем раствора доводят спиртом 70 % до метки и перемешивают (раствор Б СО сангвиритрина). Срок годности растворов 30 сут.

Около 10,0 г (точная навеска) настойки помещают в делительную воронку вместимостью 50 мл, прибавляют 2 мл аммиака раствора концентрированного 25 %, 20 мл хлороформа и встряхивают в течение 10 мин. Экстракцию повторяют еще раз с таким же количеством хлороформа. Хлороформные извлечения отделяют и фильтруют через бумажный складчатый фильтр с 2,0 г натрия сульфата безводного в круглодонную колбу. Фильтр промывают 5 мл хлороформа, который присоединяют к извлечению. Растворитель отгоняют под вакуумом с помощью роторного испарителя при нагревании на кипящей водяной бане досуха. Сухой остаток растворяют в 40 мл (порциями по 10 мл) спирта 70 % и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивают (раствор А испытуемого раствора).

2,0 мл раствора А испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, объем раствора доводят спиртом 70 % до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора).

Измеряют оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 278 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, в качестве раствора сравнения используют спирт 70 %.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО сангвиритрина.

Содержание суммы алкалоидов в пересчете на сангвиритрин в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 100 \cdot 25 \cdot 2} \cdot \frac{P}{100} = \frac{A \cdot a_0 \cdot 25 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot 100},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
A_0 – оптическая плотность раствора Б СО сангвиритрина;
a_0– навеска СО сангвиритрина, г;
a – навеска настойки, г;
P – содержание основного вещества в СО сангвиритрина, %.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Хранить с осторожностью.

Цимицифуга рацемоза **ФС.2.6.0051.18**
Цимицифуга

Cimicifuga racemosa
Cimicifuga

Настойка гомеопатическая матричная **Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на *Цимицифуга рацемоза (Цимицифуга)* **-** *Cimicifuga racemosa (Cimicifuga)* настойку гомеопатическую матричную, получаемую из собранных в течение всего вегетационного периода, свежих корневищ с корнями клопогона кистевидного – *Cimicifuga racemosa.* Nutt, сем. лютиковых – *Ranunculaceae,* применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Для получения настойки необходимо:

Клопогона кистевидного корневищ с корнями свежих	- 100 г
Спирта этилового 86 % (м/м) или 90 % (о/о)	- достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляют по способу 3 ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Описание

Жидкость от золотисто-желтого до коричневато-желтого цвета с резким, неприятным запахом.

Подлинность

1. Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов

Раствор стандартного образца (СО) 27-деоксиактеина. Около 0,025 г СО 27-деоксиактеина растворяют в 25 мл спирта 70 %. Срок годности раствора 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля на алюминиевой подложке размером 10 × 15 см наносят 20 мкл настойки и 10 мкл раствора СО 27-деоксиактеина. Пластинку сушат в сушильном шкафу при температуре 100 – 105 °С в течение 5 мин и помешают в камеру, предварительно насыщенную в течение 1 ч смесью растворителей толуол – этилформиат – муравьиная кислота безводная (50:50:10), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат на воздухе до удаления следов растворителей, обрабатывают анисового альдегида раствором уксуснокислым в метаноле и выдерживают в сушильном шкафу при температуре 110 °С в течение 5 мин и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО 27-деоксиактеина должна обнаруживаться зона адсорбции фиолетового цвета на желтом фоне.

На хроматограмме настойки должны обнаруживаться зоны адсорбции (по возрастанию) красно-синего цвета на уровне зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО 27-деоксиактеина, интенсивно красно-синего цвета, ярко-красно-синего цвета, бледно-фиолетового цвета, светло-фиолетового цвета; допускается обнаружение других слабоокрашенных зон фиолетового цвета.

2. К 2 мл настойки прибавляют 0,1 мл железа(III) хлорида раствора 3 %; должно наблюдаться темно-зеленое окрашивание (фенольные соединения).

3. 0,5 мл настойки выпаривают на кипящей водяной бане досуха. К сухому остатку прибавляют 2 капли серной кислоты раствора 20 % и 2 капли *п*-диметиламинобензальдегида раствора 0,1 %; должно наблюдаться фиолетовое окрашивание (терпеноиды).

Сухой остаток. Не менее 1,5 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,880 до 0,920 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Количественное определение. Содержание суммы фенольных соединений в пересчете на изоферуловую кислоту в настойке должно быть не менее 0,1 %.

Приготовление раствора СО изоферуловой кислоты. Около 0,05 г (точная навеска) СО изоферуловой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 5 мл спирта 70 %, перемешивают, объем раствора доводят тем же спиртом до метки, перемешивают. 1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивают. Срок годности раствора 30 суток.

Около 1,0 г (точная навеска) настойки помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, объем раствора доводят спиртом 70 % до метки, перемешивают. 5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, объем раствора доводят спиртом 70 % до метки, перемешивают (раствор А).

Оптическую плотность раствора А измеряют на спектрофотометре при длине волны 286 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют спирт 70 %.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора СО изоферуловой кислоты.

Содержание суммы фенольных соединений в пересчете на изоферуловую кислоту в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 25 \cdot 25 \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 100 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot 5 \cdot 50 \cdot 100 \cdot 100},$$

где A – оптическая плотность раствора А;

A_0 – оптическая плотность раствора СО изоферуловой кислоты;

a – навеска настойки, г;

a_0 – навеска СО изоферуловой кислоты, г;

P – содержание основного вещества в СО изоферуловой кислоты, %.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Хранить с осторожностью.

Эскулюс гиппокастанум **ФС.2.6.0052.18**
Эскулюс

Aesculus hippocastanum
Aesculus

Настойка гомеопатическая матричная **Взамен ФС 42-0121-04**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Эскулюс гиппокастанум (Эскулюс) - Aesculus hippocastanum (Aesculus) настойку гомеопатическую матричную, получаемую из свежих семян, собранных во время плодоношения растения конский каштан обыкновенный *Aesculus hippocastanum* L. сем. конскокаштановых – *Hippocastanaceae*, и применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных средств.

Для получения настойки необходимо:

Конского каштана обыкновенного семян свежих - 100 г

Спирта этилового 86 % (м/м) или 90 % (о/о) - достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляется по способу 3 ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Описание

Прозрачная жидкость желтого цвета с характерным запахом.

Подлинность

1. Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

1. Приготовление раствора стандартного образца (СО) β-эсцина. Около 0,10 г СО эсцина растворяют в 10 мл спирта 96 % перемешивают. Срок годности раствора 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят раздельно полосами 10 мм по 10 мкл настойки и раствора СО β-эсцина. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре, помещают в камеру со смесью растворителей уксусная кислота ледяная - вода - бутанол (10:40:50) и хроматографируют восходящим способом. После того как фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, хроматограмму вынимают из камеры, сушат при температуре 105 -110 °С. Затем хроматограмму обрабатывают 10 мл анисового альдегида раствором уксуснокислым в метаноле, нагревают при температуре 105 -110 °С в течение 5 – 10 мин под наблюдением и просматривают при дневном.

На хроматограмме раствора СО β-эсцина в нижней трети должна обнаруживаться сине-фиолетовая зона адсорбции; допускается обнаружение двух слабых фиолетовых зон адсорбции выше этой зоны и в верхней трети - слабой фиолетовой зоны.

На хроматограмме настойки должны обнаруживаться интенсивная серо-зеленая зона адсорбции ниже зоны СО β-эсцина и сине-фиолетовая зона на уровне зоны СО β-эсцина; допускается обнаружение нескольких зеленовато-коричневых, серых и желтоватых зон между зоной СО β-эсцина и средней третью, и одна или две фиолетовые зоны выше (сапонины).

2. К 1 мл настойки прибавляют 10 мл воды; встряхивают в течение 15 сек, должно наблюдаться образование пены, не исчезающей в течение 15 мин (сапонины).

3. К 1 мл настойки прибавляют 0,1 мл железа(III) хлорида раствора 3 %, должно наблюдаться темно-зеленое окрашивание (дубильные вещества).

4. К 1 мл настойки прибавляют 0,1 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 % и 2,5 мл спирта 96 %; должно наблюдаться зеленовато-желтое окрашивание (флавоноиды).

Сухой остаток. Не менее 5 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,880 до 0,920 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание β-эсцина в настойке должно быть не менее 0,15 %.

Приготовление растворов

Приготовление раствора стандартного образца (СО) β-эсцина. Около 0,05 г (точная навеска) СО β-эсцина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в спирте 96 % при перемешивании, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают. Срок годности раствора 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

2,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивают. Срок годности раствора 5 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Проверка пригодности хроматографической системы.

Хроматографическая система считается пригодной, если для хроматограмм раствора СО β-эсцина выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по основному пику, должна быть не менее 5000 теоретических тарелок;
- фактор асимметрии основного пика пика должен находиться в пределах от 0,8 до 1,5;
- относительное стандартное отклонение площади основного пика, рассчитанное для пяти повторностей, должно быть не более 2 %.

Около 1,0 г настойки (точная навеска) помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивают (испытуемый раствор).

Хроматографические условия

Колонка	4,6×150 мм, эндкеппированный октадецилсилисил (С18) силикагель для хроматографии, 5 мкм
Предколонка	3×4 мм, эндкеппированный октадецилсилисил (С18) силикагель для хроматографии, 5 мкм
Подвижная фаза	Смесь ацетонитрила и трифторуксусной кислоты раствора 0,05% (35:65) v/v, pH 2,2±0,05;
Способ элюирования	Изократический
Скорость потока мл/мин	1
Температура колонки, °С	От +15 до +25 °С
Детектор	Спектрофотометрический, 220 нм
Объем вводимой пробы, мкл	20
Время хроматографирования, мин	30

Хроматографируют попеременно испытуемый раствор и раствор СО β-эсцина, получая не менее 3 хроматограмм.

Результаты считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы». Расчет содержания β-эсцина проводят методом внешнего стандарта.

Содержание β-эсцина в настойке в процентах *(X)* вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot 2 \cdot 10 \cdot 100}{S_0 \cdot a \cdot 50 \cdot 10} = \frac{S \cdot a_0 \cdot 4}{S_0 \cdot a},$$

где a_0 – навеска СО β-эсцина, г;

a – навеска настойки, г;

S_0 – суммарная площадь пиков β-эсцина с относительными временами удерживания (репером служит пик с максимальной площадью) 1; 1,20 ±0,05; 1,33 ± 0,05; 1,61 ± 0,05 на хроматограмме раствора СО β-эсцина;

S – суммарная площадь пиков β-эсцина с относительными временами удерживания (репером служит пик с максимальной площадью) 1; 1,20 ±0,05; 1,33 ± 0,05; 1,61 ± 0,05 на хроматограмме настойки.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Эхинацея пурпуреа (4) **ФС.2.6.0053.18**

Echinacea purpurea (4)

Настойка гомеопатическая матричная **Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Эхинацея пурпуреа (4) - Echinacea purpurea (4) настойку гомеопатическую матричную, получаемую из высушенной травы эхинацеи пурпурной - *Echinacea purpurea* L., сем. астровых - *Asteraceae* и применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Для получения настойки необходимо:

Эхинацеи пурпурной травы высушенной - 100 г

Спирта этилового 62 % (м/м) или 70 % (о/о) - достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляют по способу 4 ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Описание. Прозрачная жидкость зеленовато-коричневого цвета, с характерным запахом.

Подлинность

1. Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор тимола 1 %. 1,0 г тимола растворяют в 100 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора 30 сут.

Раствор стандартного образца (СО) кофейной кислоты. 0,02 г СО кофейной кислоты растворяют в 10 мл спирта 70 % и перемешивают. Срок годности раствора 30 сут.

10 мл настойки помещают в делительную воронку вместимостью 200 мл, прибавляют 10 мл 0,5 М раствора хлористоводородной кислоты, 20 мл этилацетата и взбалтывают в течение 1 мин. Верхнее (этилацетатное) извлечение отделяют и сливают в колбу. Экстракцию 20 мл этилацетата повторяют еще раз. Объединенное этилацетатное извлечение помещают в делительную воронку и промывают водой по 20 мл три раза, затем фильтруют через бумажный складчатый фильтр с 1-2 г натрия сульфата безводного в круглодонную колбу со шлифом. Воронку с натрия сульфатом промывают 10 мл этилацетата, который присоединяют к объединенному извлечению. Полученное этилацетатное извлечение упаривают с помощью роторного испарителя под вакуумом при нагревании на кипящей водяной бане досуха. Сухой остаток растворяют в 1 мл спирта 96 % (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором наносят 20 мкл испытуемого раствора и 5 мкл раствора СО кофейной кислоты. Пластинку сушат на воздухе в течение 15 мин и помещают камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин смесью растворителей хлороформ – этилацетат – муравьиная кислота безводная (5:4:1) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО кофейной кислоты в средней трети пластинки должна обнаруживаться зона серого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться 4 зоны адсорбции серого цвета ниже зоны на хроматограмме СО кофейной кислоты и одна зона адсорбции серого цвета на уровне зоны СО кофейной кислоты; могут обнаруживаться несколько зон адсорбции красного цвета, одна зона между серыми, одна выше зон адсорбции серых цветов; зона

оранжево-желтого цвета ниже всех зон адсорбции серого цвета; зона светлого зеленоватого или голубоватого цвета, выше всех зон адсорбции; другие зоны серого цвета.

2. 1 мл настойки помещают в пробирку вместимостью 5 мл, прибавляют 1 мл раствора тимола 1 % и осторожно по стенке пробирки 1 мл серной кислоты концентрированной, нагревают на кипящей водяной бане в течение 5 мин; должно наблюдаться образование красно-коричневого или коричнево-красного окрашивания (углеводы).

3. К 2 мл настойки прибавляют 0,5 мл железа(III) хлорида раствора 3 %; должно наблюдаться образование черно-зеленого окрашивания (дубильные вещества).

Сухой остаток. Не менее 1,5 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,885 до 0,910 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание суммы оксикоричных кислот в пересчете на цикориевую кислоту в настойке должно быть не менее 0,05 %.

Около 10,0 г (точная навеска) настойки помещают в делительную воронку вместимостью 200 мл, прибавляют 10 мл 0,5 М раствора хлористоводородной кислоты и 20 мл этилацетата, взбалтывают в течение 1 мин. Верхнее (этилацетатное) извлечение отделяют и сливают в колбу. Экстракцию 20 мл этилацетата повторяют еще раз. Объединенное

этилацетатное извлечение помещают в делительную воронку и промывают водой по 20 мл три раза, затем фильтруют через бумажный складчатый фильтр с 1,5 г натрия сульфата безводного в круглодонную колбу со шлифом. Воронку с натрия сульфатом промывают 10 мл этилацетата, который присоединяют к объединенному извлечению. Полученное этилацетатное извлечение выпаривают с помощью роторного испарителя под вакуумом при нагревании на кипящей водяной бане досуха. Сухой остаток растворяют порциями в 23 мл спирта 96 % и переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор А).

1,0 мл раствора А переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б).

Оптическую плотность раствора Б измеряют при длине волны 330 нм, в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют спирт 96 %.

Содержание суммы оксикоричных кислот в пересчете на цикориевую кислоту в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{25 \cdot 50 \cdot A}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 1},$$

где A – оптическая плотность раствора Б;

a – навеска настойки, г;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ –удельный показатель поглощения цикориевой кислоты, при длине волны 330 нм, равный 782.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Югланс региа **ФС.2.6.0054.18**

Югланс (4а)

Juglans regia

Juglans (4a)

Настойка гомеопатическая матричная **Вводятся впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Югланс региа (Югланс) (4а) - Juglans regia (Juglans) (4a) настойку гомеопатическую матричную, получаемую из собранных в течение вегетационного периода и высушенных листьев ореха грецкого – *Juglans regia L.*, сем. ореховых – *Juglandaceae* и применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов

Для получения настойки необходимо:

Листьев ореха грецкого высушенных - 100 г

Спирта этилового 86 % (м/м) или 90 % (о/о) - достаточное количество для получения настойки

Примечание.

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляется по способу 4а ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Описание. Прозрачная жидкость от красно-коричневого до коричневого цвета с характерным запахом.

Подлинность

1. Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов

Раствор стандартного образца (СО) рутина: 0,005 г СО рутина растворяют при нагревании в 10 мл спирта 96 %. Срок годности раствора 30 сут при хранении в прохладном защищенном от света месте.

1,0 мл настойки помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят спиртом 70 % до метки и перемешивают (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят по 30 мкл испытуемого раствора и 30 мкл раствора СО рутина (см. раздел «Количественное определение»). Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 2 час в смеси растворителей этилацетат – метилэтилкетон – муравьиная кислота безводная – вода (10:6:2:2) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают, сушат при комнатной температуре до удаления следов растворителей и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограммах СО рутина должна наблюдаться зона адсорбции в верхней трети пластинки.

На хроматограмме настойки должны обнаруживаться не менее 5 зон адсорбции на уровне и ниже зоны СО рутина. Допускается наличие дополнительных зон адсорбции.

2. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Время удерживания основных пиков на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания основных пиков на хроматограмме раствора смеси СО: галловая кислота, юглон, гиперозид (см. раздел «Количественное определение»).

Сухой остаток. Не менее 3 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,920 до 0,950 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание галловой кислоты в настойке должно быть не менее 1,0 %, гиперозида - не менее 0,1 %, юглона - не менее 0,5 %.

Приготовление растворов

Раствор СО юглона. Около 0,05 г (точная навеска) СО юглона помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 20 мл метанола, перемешивают до растворения, затем доводят объем раствора метанолом до метки и снова перемешивают. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят метанолом до метки, перемешивают.

Раствор СО галловой кислоты. Около 0,05 г (точная навеска) СО галловой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 20 мл метанола, перемешивают до растворения, затем доводят объем раствора метанолом до метки и снова перемешивают. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят метанолом до метки, перемешивают.

Раствор СО гиперозида. Около 0,005 г (точная навеска) СО гиперозида помещают в колбу вместимостью 5 мл, прибавляют 2 мл метанола, встряхивают до растворения и доводят объем раствора метанолом до метки.

Смесь СО. К 5 мл СО галловой кислоты прибавляют 5 мл СО юглона и 1 мл СО гиперозида, предварительно разведенном в 25 мл элюента А.

Срок годности растворов 30 сут.

Около 5 г (точная навеска) настойки фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Фильтрат количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора спиртом до метки при температуре 20 ± 1 °С, тщательно перемешивают (испытуемый раствор).

Хроматографируют испытуемый раствор не менее 3 раз.

Хроматографические условия

Время	Элюент А	Элюент В
0 – 5 мин	100	0
5 – 10 мин	100 - 85	0 – 15
10 – 15 мин	85	15
15 – 60 мин	85 - 5	15 - 95
60 – 61 мин	5	95
61 – 70 мин	5 - 100	95 - 0

Колонка	250 × 4,6 мм, (C_{18}) для хроматографии, 5 мкм
ПФ	Элюент А – 0,1 % H_3PO_4
	Элюент В – метанол
Скорость потока	1 мл/мин
Температура колонки	30 °С
Детектор	Ультрафиолетовый детектор
	250 нм - галловая кислота
	340 нм - гиперозид и юглон
Объем вводимой пробы	20 мкл
Время хроматографирования	30 мин

Содержание каждого из веществ в процентах (Х) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 50 \cdot 100 \cdot P}{S_o \cdot 50 \cdot 50 \cdot a \cdot 100},$$

где S – площадь пика вещества на хроматограмме испытуемого раствора;

$S_{o.}$ – площадь пика вещества на хроматограмме смеси стандартных образцов;

a – навеска настойки, г;

a_o – навеска СО (галловой кислоты, юглона, гиперозида);

P – содержание основного вещества в СО вещества, %.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Югланс региа **ФС.2.6.0055.18**
Югланс

Juglans regia
Juglans

Настойка гомеопатическая матричная **Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Югланс региа (Югланс) - Juglans regia (Juglans) настойку гомеопатическую матричную, получаемую из собранных в течение всего вегетационного периода свежих листьев ореха грецкого – *Juglans regia* L., сем. ореховых – *Juglandaceae.* и применяемую для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Для получения настойки необходимо:

Ореха грецкого листьев свежих - 100 г

Спирта этилового 86 % (м/м) или 90 % (о/о) - достаточное количество для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляется по способу 2 ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Описание

Прозрачная жидкость красно-коричневого цвета с характерным запахом.

Подлинность

1. Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор СО рутина: Около 0,05 г СО рутина растворяют при нагревании на водяной бане в 100 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора 30 сут.

Около 1,0 мл настойки помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят спиртом 70 % до метки и перемешивают (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят по 30 мкл испытуемого раствора и по 30 мкл растворов СО рутина, СО кверцетина, СО лютеолина, СО гиперозида (см. раздел «Количественное определение»)., СО галловой кислоты (см. раздел «Количественное определение»). Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 2 ч смесью растворителей этилацетат – метилэтилкетон – муравьиная кислота безводная – вода (10:6:2:2) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают, сушат при комнатной температуре до удаления следов растворителей и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограммах СО рутина должна наблюдаться зона адсорбции в верхней трети пластинки.

На хроматограмме настойки должны обнаруживаться не менее 5 зон адсорбции на уровне и ниже зоны СО рутина. Допускается наличие дополнительных зон адсорбции.

2. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Время удерживания основных пиков на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания основных пиков на хроматограмме раствора смеси СО: галловая кислота, юглон, гиперозид (см. раздел «Количественное определение»).

Сухой остаток. Не менее 3 % (ОФС «Настойки»).

Плотность. От 0,920 до 0,950 (ОФС «Плотность»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Настойки»).

Метанол и 2-пропанол.** Не более 0,05 % метанола и не более 0,05 % 2-пропанола. В соответствии с требованиями ОФС «Определение метанола и 2-пропанола» **(контролируется в течение технологического процесса).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Содержание галловой кислоты в настойке должно быть не менее 0,5 %, гиперозида - не менее 0,25 %, юглона - не менее 1,5 %.

Приготовление растворов.

Раствор СО юглона. Около 0,05 г (точная навеска) СО юглона помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 20 мл метанола, перемешивают до растворения, затем доводят объем раствора метанолом до метки и снова перемешивают. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят метанолом до метки, перемешивают.

Раствор СО галловой кислоты. Около 0,05 г (точная навеска) СО галловой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 20 мл метанола, перемешивают до растворения, затем доводят объем раствора метанолом до метки и снова перемешивают. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят метанолом до метки, перемешивают.

Раствор СО гиперозида. Около 0,005 г (точная навеска) СО гиперозида помещают в колбу вместимостью 5 мл, прибавляют 2 мл метанола, встряхивают до растворения и доводят объем раствора метанолом до метки.

Смесь СО. К 5 мл СО галловой кислоты прибавляют 5 мл СО юглона и 1 мл СО гиперозида, предварительно разведенном в 25 мл элюента А.

Срок годности растворов 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около 5,0 мл (точная навеска) настойки фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Фильтрат количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора спиртом до метки при температуре 20 ± 1 °С, тщательно перемешивают (испытуемый раствор). Хроматографируют испытуемый раствор не менее 3 раз.

Хроматографические условия

Время	**Элюент А**	**Элюент В**

0 – 5 мин	100	0
5 – 10 мин	100 - 85	0 – 15
10 – 15 мин	85	15
15 – 60 мин	85 - 5	15 - 95
60 – 61 мин	5	95
61 – 70 мин	5 - 100	95 - 0

Колонка	250 × 4,6 мм, (C_{18}) для хроматографии, 5 мкм
ПФ	Элюент А – 0,1 % H_3PO_4
	Элюент В – метанол
Скорость потока	1 мл/мин
Температура колонки	30 °С
Детектор	Ультрафиолетовый детектор
	250 нм - галловая кислота
	340 нм - гиперозида и юглона
Объем вводимой пробы	20 мкл
Время хроматографирования	30 мин

Содержание каждого из веществ в процентах (Х) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_o \cdot 1 \cdot 50 \cdot 100 \cdot P}{S_o \cdot 50 \cdot 50 \cdot a \cdot 100},$$

где S – площадь пика вещества на хроматограмме испытуемого раствора;

$S_{o.}$ – площадь пика вещества на хроматограмме смеси стандартных образцов;

a – навеска настойки, г;

a_o – навеска СО (галловой кислоты, юглона, гиперозида);

P – содержание основного вещества в СО вещества, %.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Таблица. Наименования, символы и относительные атомные массы элементов

Наименование	Символ	Относительная атомная масса	Наименование	Символ	Относительная атомная масса
Азот	N	14,0067	Натрий	Na	22,990
Алюминий	Al	26,982	Неодим	Nd	144,24
Аргон	Ar	39,948	Неон	Ne	20,180
Барий	Ba	137,33	Никель	Ni	58,693
Бериллий	Be	9,0122	Ниобий	Nb	92,906
Бор	B	10,811	Олово	Sn	118,71
Бром	Br	79,904	Осмий	Os	190,23
Ванадий	V	50,942	Палладий	Pd	106,42
Висмут	Bi	208,98	Платина	Pt	195,08
Водород	H	1,00794	Празеодим	Pr	140,91
Вольфрам	W	183,84	Протактиний	Pa	231,04
Гадолиний	Gd	157,25	Рений	Re	186,21
Галлий	Ga	69,723	Родий	Rh	102,91
Гафний	Hf	178,49	Ртуть	Hg	200,59
Гелий	He	4,0026	Рубидий	Rb	85,468
Германий	Ge	72,630	Рутений	Ru	101,07
Гольмий	Ho	164,93	Самарий	Sm	150,36
Диспрозий	Dy	162,50	Свинец	Pb	207,2
Европий	Eu	151,96	Селен	Se	78,96
Железо	Fe	55,845	Сера	S	32,065
Золото	Au	196,97	Серебро	Ag	107,87
Индий	In	114,82	Скандий	Sc	44,956
Йод	I	126,90	Стронций	Sr	87,62
Иридий	Ir	192,22	Сурьма	Sb	121,76
Иттербий	Yb	173,05	Таллий	Tl	204,38
Иттрий	Y	88,906	Тантал	Ta	180,95
Кадмий	Cd	112,41	Теллур	Te	127,60
Калий	K	39,098	Тербий	Tb	158,93
Кальций	Ca	40,078	Титан	Ti	47,867
Кислород	O	15,9994	Торий	Th	232,04
Кобальт	Co	58,933	Тулий	Tm	168,93
Кремний	Si	28,086	Углерод	C	12,0107
Криптон	Kr	83,798	Уран	U	238,03
Ксенон	Xe	131,29	Фосфор	P	30,974
Лантан	La	138,91	Фтор	F	18,998
Литий	Li	6,941	Хлор	Cl	35,453

Наименование	Символ	Относительная атомная масса		Наименование	Символ	Относительная атомная масса
Лютеций	Lu	174,97		Хром	Cr	51,996
Магний	Mg	24,305		Цезий	Cs	132,91
Марганец	Mn	54,938		Церий	Ce	140,12
Медь	Cu	63,546		Цинк	Zn	65,38
Молибден	Mo	95,96		Цирконий	Zr	91,224
Мышьяк	As	74,922		Эрбий	Er	167,26

Примечание. Приведенные относительные атомные массы элементов приняты Международным союзом по теоретической и прикладной химии (IUPAC) в 2011 г и определены относительно изотопа ^{12}C.

Обозначения относительных атомных масс ограничены пятью значащими цифрами, кроме лития, цинка, селена, молибдена и свинца, массы которых определены IUPAC четырьмя значащими цифрами. Исключения сделаны для углерода, водорода, азота и кислорода для которых данные приведены с большей точностью (6 цифр), поскольку их количество в молекулах бывает большим, и предварительное округление может снизить точность расчётов.

В таблице не приведены относительные атомные массы искусственных радиоактивных элементов.

Таблица. Количество капель в 1 г и в 1 мл и масса 1 капли жидких лекарственных препаратов при температуре 20 °С по стандартному каплемеру

Наименование	Количество капель		Масса 1 капли, мг
	в 1 г	в 1 мл	
Адонизид	35	34	29
Адреналина гидрохлорида раствор 0,1%	25	25	40
Валерианы настойка	56	51	18
Валидол	54	48	19
Вода очищенная, вода для инъекций	20	20	50
Йода спиртовой раствор 10%	63	56	16
Йода спиртовой раствор 5%	49	48	20
Красавки настойка	46	44	22
Крушины экстракт жидкий	39	40	26
Ландыша настойка	56	50	18
Мяты перечной масло	51	47	20
Мяты перечной настойка	61	52	16
Нашатырно-анисовые капли	56	49	18
Никетамид	29	29	34
Нитроглицерина раствор 1%	65	53	15
Полыни настойка	56	51	18
Пустырника настойка	56	51	18
Ретинола ацетата раствор масляный	45	41	22
Хлористоводородная кислота разведённая 8,3%	20	21	50
Хлороформ	59	87	17
Эфир медицинский	87	62	11

Примечания.

1. Стандартный каплемер имеет наружный диаметр выпускной трубки 3 мм, внутренний – 0,6 мм и калибруется по дистиллированной воде путём 5-кратного взвешивания 20 капель, масса которых должна быть от 0,95 до 1,05 г.

2. Капли следует отмеривать путём свободного истечения жидкости. Рекомендуется фиксировать каплемер в штативе. Каплемер необходимо очищать хромовой смесью, промывать водой и высушивать, выпускной его конец следует защищать от ударов.

3. При отсутствии стандартного каплемера последний может быть заменён пипеткой, откалиброванной по соответствующей жидкости путём 5-кратного взвешивания 20 капель жидкости.

Таблица. Изотонические эквиваленты фармацевтических субстанций по натрия хлориду

Наименование субстанции	**Эквивалент**		**Наименование субстанции**	**Эквивалент**
Аминофиллин	0,1		Натрия метабисульфит	0,65
Апоморфина гидрохлорид	0,14		Натрия нитрит	0,83
Аскорбиновая кислота	0,18		Натрия пара-аминосалицилат	0,27
Атропина сульфат	0,10		Натрия салицилат	0,35
Борная кислота	0,53		Натрия сульфат	0,23
Декстроза (безводная)	0,18			
Дифенгидрамин	0,20		Натрия тетраборат	0,34
Калия йодид	0,35		Натрия тиосульфат	0,30
Калия хлорид	0,76		Натрия фосфат	0,40
Кальция глюконат	0,16		Натрия хлорид	1,00
Кальция хлорид	0,36		Прокаин	0,18
Кодеина фосфат	0,12		Прокаинамид	0,22
Кокаина гидрохлорид	0,14		Серебра нитрат	0,33
Кофеин-бензоат натрия	0,23		Тетракаин	0,18
Лобелина гидрохлорид	0,14		Тиамина хлорид	0,21
Магния сульфат	0,14		Тримеперидин	0,22
Меди сульфат	0,13		Физостигмина салицилат	0,16
Морфина гидрохлорид	0,15		Хлорпромазин	0,10
Натрия бензоат	0,40		Цинка сульфат	0,12
Натрия бромид	0,62			
Натрия гидрокарбонат	0,65		Эметина гидрохлорид	0,10
Натрия гидросульфит	0,60		Этилморфина гидрохлорид	0,15
Натрия йодид	0,38		Эфедрина гидрохлорид	0,28

Примечание. Изотонический эквивалент по натрия хлориду показывает количество хлорида натрия в граммах, создающее в одинаковых условиях осмотическое давление, равное осмотическому давлению 1 г данной субстанции.

Таблица позволяет определить количество натрия хлорида, необходимое для изотонирования раствора.

Пример расчёта:

Тетракаина	3 г
Натрия хлорида	достаточное количество для получения изотонического раствора
Воды для инъекций	до 1 л

Для приготовления изотонического раствора только из натрия хлорида последнего нужно взять 9 г на 1000 мл раствора (изотоническая концентрация натрия хлорида равна 0,9%). Содержащийся в прописи тетракаин (3 г) создаёт определённое осмотическое давление, вследствие чего натрия хлорида нужно взять соответственно меньше. Эквивалент 1 г тетракаина по хлориду натрия равен 0,18. Следовательно, 3 г тетракаина будут создавать осмотическое давление, равное осмотическому давлению 0,54 г натрия хлорида ($3 \cdot 0{,}18 = 0{,}54$). Таким образом, натрия хлорида необходимо взять: 9 г – 0,54 г = 8,46 г.

Алкоголеметрические таблицы

Таблица 1. Соотношение между плотностью водно-спиртового раствора и содержанием безводного спирта в растворе

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе				Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе		В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему				По массе	По объему		
0,99823	0,00	0,00	0,00	0,00	0,9908	4,14	5,20	4,10	5,25
80	12	16	13	16	6	26	35	22	41
0,9978	23	29	23	29	4	38	50	34	56
6	34	43	34	43	2	50	65	46	71
4	44	56	44	56	0	62	80	58	87
2	55	70	55	70	0,9898	75	95	70	6,02
0	66	83	66	83	6	87	6,10	81	17
0,9968	77	97	77	97	4	99	26	94	34
6	87	1,10	87	1,10	2	5,11	41	5,06	49
4	98	24	98	24	0	24	57	19	65
2	1,09	38	1,09	38	0,9888	37	73	31	81
0	20	51	19	51	6	49	88	43	97
0,9958	31	65	32	66	4	62	7,04	56	7,13
6	42	79	41	80	2	75	20	68	29
4	52	92	52	93	0	87	36	81	46
2	63	2,06	63	2,07	0,9878	6,00	52	94	62
0	74	20	74	21	6	13	67	6,05	77
0,9948	85	34	85	35	4	26	83	18	94
6	96	48	96	50	2	39	99	31	8,10
4	2,07	62	2,07	64	0	52	8,15	43	27
2	19	76	18	78	0,9868	65	32	57	44
0	29	90	29	92	6	78	48	69	61
0,9938	41	3,04	40	3,06	4	92	64	82	77
6	52	18	51	20	2	7,05	80	95	93
4	63	32	62	34	0	18	97	7,08	9,11
2	75	46	73	48	0,9858	32	9,13	21	27
0	86	60	84	63	6	45	30	34	45
0,9928	97	74	95	77	4	58	47	47	62
6	3,09	89	3,07	92	2	72	63	60	78
4	20	4,03	18	4,06	0	85	80	73	96
2	32	17	29	20	0,9848	99	97	87	10,13
0	44	32	41	36	6	8,12	10,13	8,00	30
0,9918	55	46	52	50	4	26	30	13	47
6	67	61	64	65	2	39	47	26	65
4	78	75	75	80	0	53	63	39	82
2	90	90	87	95	0,9838	67	80	52	99
0	4,02	5,05	99	5,10	6	80	97	66	11,17

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,9834	8,94	11,14	8,79	11,34
2	9,08	31	93	52
0	22	48	9,06	70
0,9828	35	65	19	87
6	49	82	33	12,04
4	63	99	46	22
2	77	12,16	60	40
0	91	34	74	58
0,9818	10,05	51	87	75
6	19	68	10,01	93
4	34	85	14	13,11
2	48	13,03	28	29
0	62	20	42	47
0,9808	76	38	56	66
6	91	55	69	83
4	11,05	73	84	14,02
2	20	90	97	20
0	34	14,08	11,11	38
0,9798	49	26	25	57
6	64	44	40	76
4	78	62	54	94
2	93	79	67	15,12
0	12,07	97	82	31
0,9788	22	15,15	96	50
6	37	34	12,11	69
4	52	52	25	88
2	67	70	39	16,07
0	81	88	53	26
0,9778	96	16,06	68	44
6	13,11	25	83	64
4	27	43	97	83
2	42	61	13,11	17,01
0	57	80	26	21
0,9768	72	98	40	40
6	87	17,17	55	60
4	14,02	35	69	79
2	18	54	84	99
0	33	73	99	18,19
0,9758	49	91	14,14	38
6	64	18,10	29	58
4	80	29	44	78
2	96	48	59	97
0	15,11	67	74	19,17

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,9748	15,27	18,86	14,89	19,37
6	43	19,05	15,04	57
4	58	24	19	77
2	74	43	34	97
0	90	62	49	20,16
0,9738	16,05	81	64	36
6	21	20,00	79	56
4	37	19	94	76
2	52	37	16,08	95
0	68	56	23	21,15
0,9728	84	75	38	35
6	99	93	52	54
4	17,15	21,12	67	74
2	30	31	82	94
0	45	49	96	22,13
0,9718	61	68	17,11	33
6	76	86	25	52
4	92	22,05	40	72
2	18,07	23	55	91
0	22	41	69	23,10
0,9708	37	60	84	31
6	52	78	98	50
4	67	96	18,12	69
2	83	23,14	26	88
0	98	32	41	24,07
0,9698	19,13	50	55	26
6	28	68	69	45
4	43	86	83	64
2	58	24,04	97	83
0	73	22	19,12	25,02
0,9688	88	40	26	21
6	20,03	57	39	40
4	18	75	53	59
2	33	93	68	77
0	47	25,11	82	96
0,9678	62	28	95	26,15
6	77	46	20,09	34
4	92	64	24	53
2	21,07	81	37	72
0	21	99	51	91
0,9668	36	26,16	65	27,09
6	50	34	79	28
4	65	51	92	47

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,9662	21,80	26,68	21,06	27,65
0	94	85	19	83
0,9658	22,09	27,03	33	28,02
6	23	20	47	20
4	37	37	60	38
2	52	54	74	56
0	66	71	87	75
0,9648	81	88	22,00	93
6	95	28,05	14	29,12
4	23,09	22	27	29
2	23	38	40	47
0	38	55	53	65
0,9638	52	72	67	83
6	66	88	79	30,00
4	80	29,05	93	18
2	94	21	23,05	36
0	24,08	38	19	54
0,9628	22	54	32	71
6	36	71	45	90
4	50	87	58	31,07
2	64	30,03	70	24
0	78	19	83	42
0,9618	92	35	95	60
6	25,05	52	24,09	78
4	19	68	21	95
2	32	84	34	32,12
0	46	31,00	47	30
0,9608	59	16	59	48
6	73	31	71	63
4	86	47	84	81
2	26,00	63	96	98
0	13	78	25,08	33,14
0,9598	26	94	21	31
6	39	32,09	33	48
4	52	24	45	64
2	65	39	56	81
0	78	54	68	96
0,9588	92	69	80	34,13
6	27,04	84	92	29
4	17	99	26,04	46
2	30	33,14	16	62

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,9580	27,43	33,29	26,27	34,79
0,9578	55	44	39	95
6	68	59	51	35,11
4	81	73	62	26
2	94	88	74	43
0	28,06	34,03	86	59
0,9568	19	17	97	75
6	31	31	27,08	90
4	43	45	19	36,06
2	56	60	31	22
0	68	74	42	37
0,9558	80	88	53	53
6	93	35,02	64	68
4	29,05	16	75	84
2	17	30	86	99
0	29	44	97	37,15
0,9548	41	58	28,07	30
6	53	72	19	46
4	65	85	30	51
2	77	99	41	76
0	89	36,13	52	92
0,9538	30,01	26	62	38,06
6	13	40	73	21
4	25	53	83	36
2	36	67	94	51
0	48	80	29,05	66
0,9528	60	94	16	81
6	72	37,07	26	96
4	84	20	36	39,10
2	95	34	47	25
0	31,07	47	57	40
0,9518	18	60	68	55
6	30	73	78	69
4	41	86	88	84
2	53	99	98	98
0	64	38,12	30,09	40,12
0,9508	76	25	19	27
6	87	38	29	42
4	99	51	39	56
2	32,10	64	50	70
0	21	77	60	85

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе				Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе		В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему				По массе	По объему		
0,9498	32,33	38,90	30,70	41,00	0,9412	36,96	44,08	34,79	46,88
6	44	39,03	81	14	0	37,07	19	88	47,01
4	55	15	90	28	0,9408	17	30	96	14
2	66	28	31,00	42	6	27	42	35,06	27
0	78	40	10	56	4	37	53	15	41
0,9488	89	53	20	71	2	47	64	23	53
6	33,00	66	30	86	0	58	75	32	66
4	11	78	40	99	0,9398	68	86	41	79
2	22	91	50	42,14	6	78	98	50	93
0	33	40,04	60	28	4	88	45,09	59	48,06
0,9478	44	16	70	42	2	98	20	68	18
6	55	28	79	56	0	38,09	31	76	31
4	66	41	89	70	0,9388	19	42	85	43
2	77	53	99	84	6	29	53	94	56
0	88	65	32,08	98	4	39	64	36,02	69
0,9468	99	78	18	43,12	2	49	75	11	82
6	34,10	90	28	26	0	59	86	20	95
4	21	41,02	38	39	0,9378	69	97	28	49,07
2	32	15	48	54	6	79	46,08	37	20
0	43	27	57	68	4	89	19	46	33
0,9458	54	39	67	81	2	99	30	54	46
6	65	51	76	95	0	39,09	41	63	58
4	76	63	86	44,08	0,9368	19	52	72	71
2	86	75	95	22	6	29	63	80	84
0	97	87	33,05	35	4	39	73	88	96
0,9448	35,08	99	14	49	2	49	84	97	50,08
6	19	42,11	24	63	0	59	95	37,06	21
4	29	23	33	76	0,9358	69	47,06	14	34
2	40	35	43	90	6	79	17	23	47
0	50	46	51	45,03	4	89	27	31	59
0,9438	61	58	61	17	2	99	38	40	72
6	71	70	70	30	0	40,09	49	48	85
4	82	82	80	44	0,9348	19	59	56	97
2	93	94	89	58	6	29	70	65	51,10
0	36,03	43,05	98	71	4	38	81	73	22
0,9428	13	17	34,07	84	2	48	92	82	35
6	24	28	16	97	0	58	48,02	90	47
4	34	39	25	46,10	0,9338	68	13	99	60
2	45	51	34	23	6	78	23	38,07	72
0	55	62	43	36	4	88	33	15	84
0,9418	65	74	52	49	2	98	44	23	97
6	76	85	61	62	0	41,07	54	31	52,09
4	86	97	70	75	0,9328	17	65	40	22

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,9326	41,27	48,75	38,48	52,34
4	36	86	56	46
2	46	96	64	58
0	56	49,07	73	71
0,9318	65	17	81	83
6	75	27	89	95
4	85	38	97	53,08
2	94	48	39,05	20
0	42,04	58	13	32
0,9308	13	69	22	45
6	23	79	30	56
4	33	89	38	68
2	42	99	46	80
0	52	50,10	54	93
0,9298	61	20	62	54,05
6	71	30	70	17
4	80	40	78	29
2	90	50	86	41
0	43,00	60	94	53
0,9288	09	71	40,02	66
6	18	81	10	78
4	28	91	18	90
2	37	51,01	26	55,02
0	47	11	34	14
0,9278	56	21	42	26
6	66	31	50	38
4	75	41	58	50
2	85	51	66	62
0	94	61	73	74
0,9268	44,04	71	81	86
6	13	81	89	98
4	23	91	97	56,10
2	32	52,00	41,04	21
0	41	10	12	33
0,9258	51	20	20	45
6	60	30	28	57
4	70	40	36	69
2	79	50	44	81
0	88	60	52	93
0,9248	98	69	59	57,04
6	45,07	79	67	16
4	16	89	74	28
2	26	99	82	40

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,9240	45,35	53,09	41,90	57,52
0,9238	44	18	97	63
6	53	28	42,05	75
4	63	38	13	88
2	72	48	21	58,00
0	81	57	28	11
0,9228	91	67	36	23
6	46,00	77	44	35
4	09	86	51	46
2	18	96	59	58
0	28	54,06	67	70
0,9218	37	15	74	81
6	46	25	82	93
4	55	34	89	59,05
2	65	44	97	17
0	74	54	43,05	29
0,9208	83	63	12	40
6	92	73	20	52
4	47,01	82	27	63
2	10	92	35	75
0	20	55,01	42	86
0,9198	29	11	50	98
6	38	20	57	60,10
4	47	30	65	22
2	56	39	72	33
0	65	48	79	44
0,9188	74	58	87	56
6	83	67	94	67
4	93	77	44,02	79
2	48,02	86	09	91
0	11	95	16	61,02
0,9178	20	56,05	24	14
6	29	14	31	25
4	38	23	38	37
2	47	33	46	49
0	56	42	53	60
0,9168	65	51	60	71
6	75	61	68	83
4	84	70	75	95
2	93	79	82	62,06
0	49,02	89	90	18
0,9158	11	98	97	29
6	20	57,07	45,04	40

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,9154	49,29	57,17	45,12	62,53
2	38	26	19	64
0	47	35	26	76
0,9148	56	44	34	87
6	65	53	41	98
4	74	62	48	63,09
2	83	72	56	21
0	92	81	63	32
0,9138	50,01	90	70	44
6	10	99	77	55
4	19	58,08	84	66
2	28	17	91	77
0	37	26	98	89
0,9128	46	35	46,05	64,00
6	55	44	12	11
4	64	54	20	23
2	73	63	27	35
0	82	72	35	46
0,9118	91	81	42	57
6	51,00	90	49	68
4	09	99	56	80
2	18	59,08	63	91
0	27	17	70	65,02
0,9108	36	26	77	14
6	45	35	84	25
4	54	44	91	36
2	63	53	99	48
0	71	62	47,06	59
0,9098	80	71	13	70
6	89	80	20	82
4	98	89	27	93
2	52,07	98	34	66,05
0	16	60,07	41	16
0,9088	25	16	48	27
6	34	25	55	39
4	43	34	62	50
2	52	43	70	61
0	60	52	77	72
0,9078	69	60	83	83
6	78	69	90	95
4	87	78	97	67,06
2	96	87	48,04	17
0	53,05	96	11	29

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,9068	53,14	61,05	48,18	67,41
6	22	14	26	52
4	31	22	32	62
2	40	31	39	73
0	49	40	46	85
0,9058	58	49	53	97
6	67	57	60	68,07
4	75	66	67	19
2	84	75	74	30
0	93	84	81	41
0,9048	54,02	92	87	52
6	11	62,01	94	63
4	19	10	49,01	75
2	28	19	08	87
0	37	27	15	96
0,9038	46	36	22	69,08
6	54	45	29	19
4	63	53	35	30
2	72	62	42	42
0	81	71	50	53
0,9028	89	79	56	63
6	98	88	63	74
4	55,07	97	70	86
2	16	63,05	76	97
0	25	14	83	70,08
0,9018	33	22	90	19
6	42	31	97	30
4	51	40	50,04	42
2	60	48	10	52
0	68	57	17	64
0,9008	77	65	24	75
6	86	74	31	86
4	95	82	37	97
2	56,03	91	44	71,08
0	12	64,00	51	20
0,8998	21	08	58	30
6	30	17	65	42
4	38	25	71	53
2	47	34	78	64
0	56	42	84	75
0,8988	65	51	92	86
6	73	59	99	97
4	82	68	51,05	72,08

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,8982	56,91	64,76	51,11	72,19
0	57,00	85	18	30
0,8978	08	93	25	41
6	17	65,02	32	53
4	26	10	38	63
2	34	18	44	73
0	43	27	52	85
0,8968	52	35	58	96
6	60	43	64	73,06
4	69	52	71	18
2	78	61	78	30
0	87	69	85	41
0,8958	95	77	91	51
6	58,04	86	99	63
4	13	94	52,05	73
2	21	66,02	11	84
0	30	11	18	95
0,8948	39	19	24	74,06
6	47	27	30	17
4	56	36	38	29
2	65	44	44	39
0	74	53	51	51
0,8938	82	61	57	61
6	91	69	64	72
4	59,00	77	70	83
2	08	86	77	95
0	17	94	83	75,05
0,8928	26	67,02	90	16
6	34	11	97	27
4	43	19	53,03	39
2	52	27	09	49
0	60	36	17	61
0,8918	69	44	23	72
6	77	52	29	83
4	86	61	36	94
2	95	69	43	76,05
0	60,03	77	49	15
0,8908	12	85	55	26
6	21	94	62	38
4	29	68,02	69	49
2	38	10	75	59
0	47	18	81	70
0,8898	55	26	88	81

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,8986	60,64	68,35	53,95	76,93
4	72	43	54,01	77,04
2	81	51	07	14
0	90	59	14	25
0,8888	98	67	20	36
6	61,07	75	26	47
4	15	83	33	57
2	24	91	39	68
0	33	69,00	46	80
0,8878	41	08	52	91
6	50	16	59	78,02
4	58	24	65	12
2	67	32	71	23
0	76	40	78	34
0,8868	84	48	84	45
6	93	56	90	56
4	62,01	64	96	66
2	10	72	55,03	77
0	18	80	09	88
0,8858	27	88	15	99
6	36	96	22	79,10
4	44	70,05	29	21
2	53	12	34	31
0	61	20	41	42
0,8848	70	28	47	53
6	79	36	53	64
4	87	45	60	75
2	96	53	67	86
0	63,04	61	73	97
0,8838	13	69	79	80,08
6	21	77	86	19
4	30	85	92	30
2	39	93	98	40
0	47	71,01	56,05	51
0,8828	56	09	11	62
6	64	17	17	73
4	73	25	24	84
2	82	33	30	95
0	90	41	36	81,06
0,8818	99	49	42	17
6	64,07	57	49	28
4	16	65	55	39
2	24	72	61	49

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,8810	64,33	71,80	56,67	81,60
0,8808	41	88	73	70
6	50	96	80	81
4	59	72,04	86	93
2	67	12	92	82,04
0	76	20	99	15
0,8798	84	28	57,05	25
6	93	36	11	36
4	65,01	44	17	47
2	10	51	23	57
0	18	59	29	68
0,8788	27	67	36	79
6	35	75	42	90
4	44	83	48	83,01
2	52	91	55	12
0	61	98	60	22
0,8778	69	73,06	66	33
6	78	14	73	45
4	86	22	79	56
2	95	29	85	66
0	66,03	37	91	77
0,8768	12	45	97	87
6	20	53	58,03	98
4	29	60	09	84,08
2	37	68	15	19
0	46	76	22	30
0,8758	54	84	28	42
6	63	91	33	51
4	71	99	40	63
2	80	74,07	46	74
0	88	15	52	85
0,8748	97	22	58	95
6	67,05	30	64	85,06
4	14	37	70	16
2	22	45	76	27
0	31	53	82	38
0,8738	39	61	89	49
6	47	68	94	59
4	56	76	59,01	70
2	64	84	07	81
0	73	91	12	91
0,8728	81	99	19	86,03
6	90	75,06	24	12

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,8724	67,98	75,14	59,31	86,24
2	68,07	22	37	35
0	15	29	42	45
0,8718	24	37	49	56
6	32	45	55	67
4	41	52	61	77
2	49	60	67	89
0	58	68	73	87,00
0,8708	66	75	79	10
6	75	83	85	21
4	83	90	91	31
2	92	98	97	42
0	69,00	76,06	60,03	53
0,8698	08	13	09	63
6	17	21	15	74
4	25	28	21	85
2	34	36	27	96
0	42	43	32	88,06
0,8688	51	51	39	17
6	59	58	44	27
4	68	66	51	38
2	76	74	57	50
0	84	81	62	60
0,8678	93	89	69	71
6	70,01	96	74	81
4	10	77,04	81	93
2	18	11	86	89,02
0	26	19	92	14
0,8668	35	26	98	24
6	43	33	61,03	34
4	52	41	10	46
2	60	48	15	56
0	68	56	22	67
0,8658	77	63	27	77
6	85	70	33	88
4	94	78	39	99
2	71,02	85	44	90,09
0	10	93	51	21
0,8648	19	78,00	56	31
6	27	07	62	41
4	36	15	68	53
2	44	22	74	63
0	52	29	79	73

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,8638	71,61	78,37	61,86	90,84
6	69	44	91	95
4	77	51	97	91,05
2	86	59	62,03	16
0	94	66	08	26
0,8628	72,03	73	14	36
6	11	81	20	47
4	19	88	26	57
2	28	95	31	68
0	37	79,03	38	79
0,8618	44	10	43	90
6	53	17	49	92,00
4	61	24	54	10
2	69	32	60	22
0	78	39	66	32
0,8608	86	46	72	42
6	95	53	77	52
4	73,03	61	83	64
2	11	68	89	74
0	20	75	94	84
0,8598	28	83	63,01	96
6	36	90	06	93,06
4	45	97	12	16
2	53	80,04	17	27
0	61	11	23	37
0,8588	70	19	29	49
6	78	26	35	59
4	86	33	40	70
2	95	40	46	80
0	74,03	47	51	90
0,8578	11	54	57	94,01
6	20	62	63	13
4	28	69	69	23
2	36	76	74	33
0	44	83	80	43
0,8568	53	90	85	54
6	61	97	91	64
4	69	81,05	97	76
2	78	12	64,03	87
0	86	19	08	97
0,8558	94	26	14	95,07
6	75,02	33	19	17
4	11	40	25	28

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,8552	75,19	81,47	64,30	95,38
0	27	54	36	49
0,8548	35	61	41	59
6	44	68	47	70
4	52	75	52	80
2	60	82	58	90
0	69	89	63	96,01
0,8538	77	96	68	11
6	85	82,03	74	21
4	93	10	80	32
2	76,01	17	85	43
0	10	24	91	53
0,8528	18	31	96	63
6	26	38	65,02	74
4	35	45	08	85
2	43	52	13	95
0	51	59	19	97,06
0,8518	59	66	24	16
6	67	73	30	27
4	76	80	35	38
2	84	87	41	48
0	92	94	46	59
0,8508	77,00	83,01	52	69
6	09	08	57	80
4	17	14	62	89
2	25	21	68	99
0	33	28	73	98,10
0,8498	42	35	79	20
6	50	42	84	31
4	58	49	90	42
2	66	56	95	53
0	74	63	66,01	63
0,8488	83	69	05	73
6	91	76	11	83
4	99	83	16	93
2	78,07	90	22	99,04
0	16	97	28	15
0,8478	24	84,04	33	25
6	32	10	38	34
4	40	17	43	45
2	48	24	49	56
0	56	31	54	67
0,8468	64	38	60	78

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,8466	78,73	84,44	66,65	99,87
4	81	51	70	98
2	89	58	76	100,08
0	97	65	81	19
0,8458	79,05	71	86	28
6	13	78	91	39
4	22	85	97	50
2	30	91	67,02	60
0	38	98	07	70
0,8448	46	85,05	13	80
6	54	12	18	91
4	62	18	23	101,01
2	70	25	29	12
0	78	32	34	23
0,8438	87	38	39	32
6	95	45	44	42
4	80,03	51	49	52
2	11	58	55	63
0	19	65	60	74
0,8428	27	71	65	83
6	35	78	70	94
4	43	85	76	102,04
2	51	91	81	14
0	60	98	86	25
0,8418	68	86,05	92	36
6	76	11	96	45
4	84	18	68,02	56
2	92	24	07	65
0	81,00	31	12	76
0,8408	08	37	17	85
6	16	44	22	96
4	24	50	27	103,06
2	32	57	33	17
0	40	63	37	26
0,8398	48	70	43	37
6	56	76	48	47
4	64	83	53	58
2	72	89	58	67
0	80	96	63	78
0,8388	88	87,02	68	87
6	96	09	74	98
4	82,04	15	78	104,08
2	12	21	83	18

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,8380	82,20	87,28	68,89	104,29
0,8378	28	34	93	38
6	36	41	99	49
4	44	47	69,04	59
2	52	53	08	68
0	60	60	14	79
0,8368	68	66	19	89
6	76	72	23	98
4	84	79	29	105,09
2	92	85	34	19
0	83,00	92	39	30
0,8358	08	98	44	40
6	16	88,04	49	49
4	24	11	54	61
2	32	17	59	70
0	40	23	64	80
0,8348	48	29	68	89
6	56	36	74	106,01
4	64	42	79	10
2	72	48	83	20
0	80	54	88	30
0,8338	88	61	94	42
6	96	67	98	51
4	84,04	73	70,03	61
2	11	79	08	70
0	19	86	13	82
0,8328	27	92	18	91
6	35	98	23	107,01
4	43	89,04	28	10
2	51	10	32	20
0	59	16	37	30
0,8318	67	23	43	42
6	74	29	47	52
4	82	35	52	61
2	90	41	57	71
0	98	47	62	80
0,8308	85,06	53	66	91
6	14	59	71	108,00
4	21	65	76	10
2	29	71	81	20
0	37	77	85	29
0,8298	45	83	90	39
6	53	90	96	51

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,8294	85,61	89,96	71,00	108,61
2	68	90,02	05	70
0	76	08	10	81
0,8288	84	14	14	90
6	92	20	19	109,00
4	86,00	26	24	10
2	07	32	29	20
0	15	38	33	30
0,8278	23	43	37	38
6	31	49	42	48
4	38	55	47	58
2	46	61	52	68
0	54	67	56	78
0,8268	62	73	61	88
6	69	79	66	98
4	77	85	71	110,08
2	85	91	75	18
0	93	97	80	28
0,8258	87,00	91,03	85	38
6	08	09	89	48
4	16	15	94	58
2	24	20	98	66
0	31	26	72,03	76
0,8248	39	32	08	86
6	47	38	12	96
4	54	44	18	111,06
2	62	50	23	16
0	70	55	27	25
0,8238	78	61	32	35
6	85	67	36	45
4	93	73	41	55
2	88,01	79	45	65
0	08	85	50	75
0,8228	16	90	53	83
6	24	96	58	93
4	31	92,02	63	112,03
2	39	08	68	14
0	47	13	72	22
0,8218	54	19	76	32
6	62	25	81	42
4	69	30	85	51
2	77	36	90	61
0	85	42	94	71

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,8208	88,92	92,47	72,98	112,81
6	89,00	53	73,03	91
4	08	58	07	113,00
2	15	64	12	10
0	23	70	17	20
0,8198	30	75	20	29
6	38	81	25	39
4	45	87	30	49
2	53	92	34	58
0	60	98	39	68
0,8188	68	93,04	43	78
6	75	09	47	86
4	83	14	51	95
2	91	20	56	114,06
0	98	25	60	15
0,8178	90,06	31	65	25
6	13	36	69	33
4	21	42	73	44
2	28	47	77	53
0	35	53	82	63
0,8168	43	58	86	72
6	50	63	90	80
4	58	69	95	91
2	65	74	99	115,00
0	73	80	74,03	10
0,8158	80	85	07	19
6	88	91	12	30
4	95	96	16	38
2	91,03	94,02	21	49
0	10	07	25	58
0,8148	17	12	29	67
6	25	17	33	76
4	32	23	37	86
2	39	28	41	95
0	47	33	45	116,03
0,8138	54	38	49	12
6	61	43	53	21
4	69	49	58	32
2	76	54	62	41
0	83	59	66	50
0,8128	91	64	70	59
6	98	70	74	70
4	92,05	75	78	78

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,8122	92,13	94,80	74,82	116,87
0	20	85	86	96
0,8118	27	91	91	117,07
6	35	96	95	16
4	42	95,01	99	25
2	49	06	75,03	34
0	56	11	07	43
0,8108	64	16	11	52
6	71	21	15	61
4	78	26	19	70
2	85	31	22	80
0	93	36	26	89
0,8098	93,00	41	30	98
6	07	46	34	118,07
4	14	52	39	18
2	22	57	43	27
0	29	62	47	36
0,8088	36	67	51	45
6	43	72	55	54
4	50	77	59	63
2	58	82	63	73
0	65	87	67	82
0,8078	72	92	71	91
6	79	97	75	119,00
4	86	96,02	79	09
2	94	07	83	18
0	94,01	12	86	27
0,8068	08	16	90	35
6	15	21	94	44
4	22	26	98	53
2	29	31	76,02	63
0	36	36	05	72
0,8058	43	41	09	81
6	50	45	13	89
4	57	50	16	98
2	65	55	20	120,08
0	72	60	24	17
0,8048	79	65	28	26
6	86	70	32	35
4	93	74	35	43
2	95,00	79	39	52
0	07	84	43	61
0,8038	14	89	47	70

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,8036	95,21	96,94	76,51	120,80
4	28	99	55	89
2	35	97,03	58	97
0	42	08	62	121,06
0,8028	49	12	65	14
6	56	17	69	23
4	63	22	74	33
2	70	26	77	40
0	77	31	81	50
0,8018	84	35	85	58
6	91	40	88	67
4	98	44	92	75
2	96,04	49	96	84
0	11	54	77,00	94
0,8008	18	58	03	122,01
6	25	63	07	11
4	32	67	10	19
2	39	72	14	29
0	46	76	17	36
0,7998	52	81	21	46
6	59	86	25	55
4	66	90	28	63
2	73	95	32	72
0	80	99	35	80
0,7988	87	98,04	38	90
6	93	08	41	98
4	97,00	12	44	123,06
2	07	17	48	16
0	14	21	53	24
0,7978	20	25	56	32
6	27	29	59	40
4	34	34	63	50
2	41	38	66	58
0	47	42	69	66
0,7968	54	47	73	76
6	61	51	76	84
4	67	55	79	92
2	74	59	83	99
0	81	64	86	124,09
0,7958	88	68	90	17
6	94	72	93	25
4	98,01	77	97	35
2	08	81	78,00	43

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,7950	98,14	98,85	78,03	124,51
0,7948	21	89	06	59
6	27	94	09	69
4	34	98	12	77
2	41	99,02	15	85
0	47	06	19	93
0,7938	54	10	22	125,02
6	60	14	25	10
4	67	18	28	18
2	74	22	31	26
0	80	26	34	34
0,7928	87	30	37	43
6	93	34	41	51
4	99,00	38	44	59
2	06	42	47	67
0	13	46	50	75

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,7918	99,19	99,50	78,53	125,84
6	26	54	56	92
4	32	58	60	126,01
2	38	62	63	09
0	45	66	66	17
0,7908	51	70	69	25
6	58	74	72	33
4	64	78	75	42
2	70	82	78	50
0	77	86	82	58
0,7898	83	89	84	64
6	89	93	87	72
4	96	97	90	81
0,78927	100,00	100,00	78,93	126,87

Таблица 2. Массовые количества (в граммах при температуре 20 °С) воды и спирта различной крепости, которые необходимо смешать, чтобы получить 1 кг спирта крепостью от 30 до 92%

Крепость взятого спирта, %	30%		40%		50%		60%		70%		80%		90%		92%	
	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода
96	262	738	355	645	452	548	555	445	665	335	783	217	913	87	941	59
95	266	734	360	640	459	541	564	436	675	325	795	205	927	73	955	45
94	270	730	366	634	466	534	572	428	686	314	807	193	941	59	970	30
93	275	725	371	629	473	527	681	419	696	304	820	180	956	44	985	15
92	279	721	377	623	481	519	590	410	707	293	832	168	970	30		
91	283	717	383	617	488	512	599	401	717	283	845	155	985	15		
90	287	713	389	611	495	505	608	392	728	272	858	142				
89	292	708	395	605	503	497	617	383	739	261	871	129				
88	296	704	401	599	511	489	627	373	751	249	884	116				
87	301	699	407	593	518	482	636	364	762	238	898	102				
86	305	695	413	587	526	474	646	354	774	226	911	89				
85	310	690	419	581	534	466	656	344	786	214	925	75				
84	315	685	426	574	543	457	666	334	798	202	940	60				
83	320	680	432	568	551	449	676	324	810	190	954	46				
82	325	675	439	561	560	440	687	313	823	177	969	31				
81	330	670	446	554	568	432	698	302	836	164	984	16				
80	335	665	453	547	577	423	709	291	849	151						
79	340	660	460	540	587	413	720	280	863	137						
78	346	654	468	532	596	404	732	268	876	124						
77	351	649	475	525	605	395	743	257	890	110						
76	357	643	483	517	615	385	755	245	905	95						
75	363	637	491	509	625	375	768	232	920	80						
74	369	631	499	501	636	364	781	219	935	65						
73	375	625	507	493	646	354	794	206	951	49						
72	381	619	516	484	657	343	807	193	967	33						
71	388	612	525	475	669	331	821	179	983	17						

Крепость взятого спирта, %	30%		40%		50%		60%		70%		80%		90%		92%	
	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода
70	394	606	534	466	680	320	835	165								
69	401	599	543	457	692	308	849	151								
68	408	592	553	447	704	296	864	136								
67	416	584	562	438	716	284	879	121								
66	423	577	572	428	729	271	895	105								
65	431	569	583	417	742	258	911	89								
64	438	562	593	407	756	244	928	72								
63	447	553	604	396	770	230	945	55								
62	455	545	616	384	784	216	963	37								
61	464	536	627	373	799	201	981	19								
60	472	528	639	361	815	185										
59	482	518	652	348	830	170										
58	491	509	665	335	847	153										
57	501	499	678	322	864	136										
56	511	489	692	308	881	119										
55	522	478	706	294	899	101										
54	532	468	720	280	918	82										
53	544	456	736	264	937	63										
52	555	445	751	249	958	42										
51	567	433	768	232	978	22										
50	580	420	785	215												
49	593	407	803	197												
48	607	393	821	179												
47	621	379	840	160												
46	636	364	860	140												
45	651	349	881	119												
44	667	333	902	98												
43	684	316	925	75												
42	701	299	949	51												
41	720	280	974	26												

Крепость взятого спирта, %	30%		40%		50%		60%		70%		80%		90%		92%	
	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода
40	739	261														
39	759	241														
38	781	219														
37	803	197														
36	826	174														
35	851	149														
34	878	122														
33	905	95														
32	935	65														

Таблица 3. Объёмные количества воды, добавляемые к 1 л спирта известной концентрации для получения заданной крепости спирта от 30 до 90% (о/о)

Концентрация разводимого спирта (о/о, %)	Приливаемый объём воды для получения желаемой концентрации (о/о) спирта												
	30%	35%	40%	45%	50%	55%	60%	65%	70%	75%	80%	85%	90%
35	167												
40	335	144											
45	505	290	127										
50	674	436	255	114									
55	845	583	384	229	103								
60	1017	730	514	344	207	95							
65	1189	878	644	460	311	190	88						
70	1360	1027	774	577	417	285	175	81					
75	1535	1177	906	694	523	382	264	163	76				
80	1709	1327	1039	812	630	480	353	246	153	72			
85	1884	1478	1172	932	738	578	443	329	231	144	68		
90	2061	1630	1306	1052	847	677	535	414	310	218	138	65	
95	2239	1785	1443	1174	957	779	629	501	391	295	209	133	64

Примечание. Цифра в месте пересечения горизонтальной и вертикальной строк указывает объём воды при температуре 20 ^{o}C в мл, который следует прилить к 1000 мл спирта указанной в левом столбце объёмной концентрации при температуре 20 ^{o}C, для получения концентрации спирта, указанной в верхней строке. Пример: для получения 50% спирта из имеющегося 80 % 1000 объёмов последнего следует смешать с 630 объёмами воды.

Таблица 4. Объёмные количества спирта крепостью от 35 до 95% (в мл при температуре 20 °С), которые необходимо смешать для получения 1 л спирта крепостью от 30 до 90 %

Спирт исходный, %	30%		35%		40%		45%		50%		55%		60%		65%		70%		75%		80%		85%		90%	
	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода
95	316	707	368	658	421	607	474	556	526	504	579	451	632	397	684	343	737	288	789	233	842	176	895	119	947	61
90	333	687	389	634	444	581	500	526	556	470	611	414	667	357	722	299	778	240	833	182	889	122	944	62		
85	353	665	412	609	471	551	529	493	588	434	647	374	706	313	765	252	824	190	882	127	941	64				
80	375	641	438	581	500	519	562	457	625	394	688	330	750	265	812	200	875	134	938	67						
75	400	614	467	549	533	483	600	417	667	349	733	280	800	211	867	141	933	71								
70	429	584	500	514	571	443	643	371	714	298	786	225	857	150	929											
65	462	549	538	473	615	396	692	319	769	240	846	161	923	81												
60	500	509	583	426	667	343	750	258	833	173	916	87														
55	545	462	636	371	727	279	818	187	909	94																
50	600	405	700	305	800	204	900	103																		
45	667	336	778	225	889	113																				
40	750	252	875	126																						
35	857	143																								

Таблица 5. Объёмные количества спирта крепостью от 95,1 до 96,5% (в мл при температуре 20 °С) и воды, которые необходимо смешать для получения 1 л спирта крепостью от 30 до 90 объёмных процентов

Спирт исходный % (о/о)	30%		35%		40%		45%		50%		55%		60%	
	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода
96,5	310,9	713,1	362,7	664,7	414,5	615,3	466,3	565,0	518,1	513,8	569,9	461,8	621,8	409,1
96,4	311,2	712,7	363,1	664,2	414,9	614,8	466,8	564,4	518,7	513,1	570,5	461,1	622,4	408,3
96,3	311,5	712,3	363,4	663,8	415,4	614,3	467,3	563,8	519,2	512,5	571,1	460,4	623,1	407,6
96,2	311,9	712,0	363,8	663,3	415,8	613,7	467,8	563,2	519,8	511,8	571,7	459,7	623,7	406,8
96,1	312,2	711,6	364,2	662,9	416,2	613,2	468,2	562,6	520,3	511,2	572,3	458,9	624,3	406,0
96,0	312,5	711,2	364,6	662,4	416,7	612,7	468,8	562,0	520,8	510,5	572,9	458,2	625,0	405,2
95,9	312,8	710,8	365,0	662,0	417,1	612,2	469,2	561,5	521,4	509,9	573,5	457,5	625,7	404,4
95,8	313,2	710,4	365,3	661,5	417,5	611,7	469,7	560,9	521,9	509,2	574,1	456,8	626,3	403,7
95,7	313,5	710,0	365,7	661,1	418,0	611,1	470,2	560,3	522,5	508,6	574,7	456,1	627,0	402,9
95,6	313,8	709,6	366,1	660,6	418,4	610,6	470,7	559,7	523,0	507,9	575,3	455,4	627,6	402,1
95,5	314,1	709,2	366,5	660,1	418,8	610,1	471,2	559,1	523,6	507,3	575,9	454,7	628,3	401,3
95,4	314,5	708,8	366,9	659,7	419,3	609,6	471,7	558,5	524,1	506,6	576,5	453,9	628,9	400,5
95,3	314,8	708,4	367,3	659,2	419,7	609,1	472,2	558,0	524,7	506,0	577,1	453,2	629,6	399,7
95,2	315,1	708,0	367,6	658,8	420,2	608,5	472,7	557,4	525,2	505,3	577,7	452,5	630,3	399,0
95,1	315,5	707,6	368,0	658,3	420,6	608,0	473,2	556,8	525,8	504,7	578,3	451,8	630,9	398,2

Продолжение

Спирт исходный % (о/о)	65%		70%		75%		80%		85%		90%		95%	
	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода
96,5	673,6	355,8	725,4	301,8	777,2	247,2	829,0	192,0	880,8	135,8	932,6	78,2	984,5	18,6
96,4	674,3	354,9	726,1	300,9	778,0	246,3	829,9	190,9	881,7	134,7	933,6	77,1	985,5	17,3
96,3	675,0	354,1	726,9	300,0	778,8	245,3	830,7	189,9	882,7	133,6	934,6	75,9	986,5	16,1
96,2	675,7	353,2	727,7	299,1	779,6	244,3	831,6	188,8	883,6	132,4	935,6	74,7	987,5	14,9
96,1	676,4	352,4	728,4	298,2	780,4	243,3	832,5	187,8	884,5	131,3	936,5	73,6	988,6	13,6
96,0	677,1	351,5	729,2	297,2	781,3	242,4	833,3	186,8	885,4	130,2	937,5	72,4	989,6	12,4
95,9	677,8	350,7	729,9	296,3	782,1	241,4	834,2	185,7	886,3	129,1	938,5	71,2	990,6	11,2
95,8	678,5	349,8	730,7	295,4	782,9	240,4	835,1	184,7	887,3	128,0	939,5	70,0	991,6	9,9
95,7	679,2	349,0	731,5	294,5	783,7	239,4	835,9	183,6	888,2	126,9	940,4	68,9	992,7	8,7
95,6	679,9	348,2	732,2	293,6	784,5	238,5	836,8	182,6	889,1	125,8	941,4	67,7	993,7	7,5
95,5	680,6	347,3	733,0	292,7	785,3	237,5	837,7	181,6	890,1	124,7	942,4	66,5	994,8	6,2
95,4	681,3	346,5	733,7	291,8	786,2	236,5	838,6	180,5	891,0	123,6	943,4	65,4	995,8	5,0
95,3	682,1	345,6	734,5	290,9	787,0	235,5	839,5	179,5	891,9	122,5	944,4	64,2	996,8	3,7
95,2	682,8	344,8	735,3	290,0	787,8	234,5	840,3	178,4	892,9	121,4	945,4	63,0	997,9	2,5
95,1	683,5	343,9	736,1	289,0	788,6	233,6	841,2	177,4	893,8	120,3	946,4	61,8	998,9	1,3