**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |

## 

**Пустырника экстракт сухой** **ФС**

**Leonuri еxtractum siccum** **Вводится впервые**

Пустырника экстракт сухой, получаемый 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* (ФС.2.5.0034.15) (соотношение сырья к конечному продукту около (5-12) : 1, экстрагент - спирт этиловый 25-40 % или вода) с содержанием суммы флавоноидов в пересчёте на рутин не менее 0,5 %, и применяемый для производства лекарственных препаратов.

**Описание**

Аморфный порошок от светло-коричневого до темно-коричневого цвета с характерным запахом. Допускаются темные вкрапления.

\*Гигроскопичен, комкуется.

**Подлинность**

Около 1,0 г субстанции помещают в химический стакан, прибавляют 25 мл этанола 70 % и растворяют, перемешивая на магнитной мешалке в течение 20 мин. Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

1. **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.

Около 1,5 г субстанции помещают в химический стакан, прибавляют 30 мл спирта 50 % и растворяют, перемешивая на магнитной мешалке в течение 20 мин. Полученный раствор фильтруют в коническую колбу через бумажный фильтр «красная лента». Объем полученного извлечения доводят спиртом 50 % до 50 мл и тщательно перемешивают. 10 мл полученного раствора помещают в делительную воронку вместимостью 100 мл, прибавляют 5 мл воды и 10 мл смеси хлороформ - спирт 96 % (5:1), взбалтывают в течение 5 мин. После расслаивания хлороформный слой фильтруют через бумажный фильтр «красная лента» с 2 г натрия сульфата безводного, смоченного смесью хлороформ - спирт 96 % (5:1), в стакан вместимостью 100 мл.

Процедуру извлечения повторяют еще раз, используя 10 мл смеси хлороформ - спирт 96 % (5:1), фильтруя извлечения в тот же стакан, через тот же фильтр. Фильтр с натрия сульфата безводным промывают 5 мл смеси хлороформ - спирт 96 % (5:1). Полученный фильтрат отгоняют под вакуумом на роторном испарителе до объема около 0,3 мл, остаток смеси хлороформ- спирт удаляют продуванием воздухом или фильтрат упаривают под струей холодного воздуха до отсутствия запаха хлороформа. Сухой остаток растворяют в 1,0 мл спирта 96 % (испытуемый раствор).

На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля на алюминиевой или полимерной подложке размером 10 × 10 см в виде полос длиной 10 мм, шириной не более 3 мм наносят 20 мкл (0,02 мл) испытуемого раствора 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, Затем пластинку обрабатывают диметиламинобензальдегида раствором в смеси фосфорной и уксусной кислот, выдерживают при температуре около 100 °С в течение 10 мин и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО метилового красного должна обнаруживаться зона розового или красного цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться не менее двух зон адсорбции от синего до фиолетового цвета выше зоны СО метилового красного; допускается обнаружение других зон адсорбции (иридоиды).

1. ***Тонкослойная хроматография***

Около 0,5 г субстанции помещают в коническую колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 10 мл горячего раствора натрия гидроксида 10 % и выдерживают на водяной бане течение 5 мин. Полученный раствор фильтруют в колбу через бумажный фильтр «красная лента». Полученное извлечение охлаждают, фильтруют через воронку с ватным фильтром, смоченным водой и наносят на хроматографическую колонку, заполненную полиамидом для колоночной хроматографии из расчета 1,0 г полиамида на 30 мл воды.

Колонку промывают водой три раза по 10 мл, не допуская высыхания поверхности сорбента. Водный элюат отбрасывают, элюирование флавоноидов проводят 25 мл спирта 96 % со скоростью 4 мл/мин. Первую бесцветную фракцию элюата отбрасывают; следующую темно-желтую собирают в круглодонную колбу вместимостью 100 мл и отгоняю растворитель при температуре не выше 50 °С досуха. Сухой остаток растворяют в 2,0 мл метанола (испытуемый раствор).

На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля на алюминиевой или пластиковой подложке размером 10 × 15 см наносят в виде полос длиной 10 мм и шириной не более 2 мм 20 мкл (0,02 мл) испытуемого раствора и 10 мкл (0,01 мл) раствора А СО рутина (см. раздел «Количественное определение»). Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре в течение 10 мин, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 1 ч смесью растворителей бутанол – уксусная кислота ледяная – вода (40:10:20), 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, обрабатывают алюминия хлорида раствором 2 % в спирте 96 %, выдерживают при температуре около 100 °С в течение 2 – 3 мин и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО рутина в средней трети пластинки должна обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией желтого или желтовато-зеленого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией желтого или желтовато-зеленого цвета на уровне зоны адсорбции СО рутина; допускается обнаружение других зон адсорбции (флавоноиды).

1. К 2 мл испытуемого раствора прибавляют 3 мл железа(III) хлорида раствора 3 %; должно наблюдаться зеленое окрашивание (фенольные соединения).
2. К 2 мл испытуемого раствора прибавляют 2 мл медно-тартратного реактива и нагревают на кипящей водяной бане в течение 5 мин; должен выпадать осадок красно-коричневого цвета (восстанавливающие вещества).

**Потеря в массе при высушивании.** Не более 8,0 %. В соответствии с требованиями ОФС «Потеря в массе при высушивании**».**

**Остаточные органические растворители.** Содержание этанола в суб­станции должно быть не более 0,5 %. В соответствии с требованиями ОФС «Остаточные органические растворители».

Остаточное содержание этанола в субстанции определяют методом га­зожидкостной хроматографии (ГЖХ).

*Приготовление растворов*.

*Раствор стандартного образца (СО) этанола*. Около 1,04 г (точная навеска) этанола 96 % помещают в мерную колбу вместимостью 200 мл, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают. 1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

*Проверка пригодности хроматографической системы.*

Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются следующие условия:

- относительное стандартное отклонение площадей пика этанола при пяти повторных введениях раствора СО должно быть не более 5,0 %;

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику этанола, должно быть не менее 1000 теоретических тарелок;

- фактор асимметрии пика этанола должен быть не более 2,0.

Около 1,0 г (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 10 мл воды, закрывают пробкой и перемешивают на магнитной мешалке до полного растворения. Содержимое колбы доводят водой до метки и перемешивают. Раствор переносят в цен­трифужную пробирку, центрифугируют при 3000 об/мин в течение 30 мин, после чего отбирают пипеткой около 2 мл надосадочной жидкости (испытуемый раствор 3).

По 5 мкл испытуемого и стандартного растворов последовательно хроматографируют, получая для каждого раствора не менее 3 хроматограмм в следующих условиях:

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | насадочная 2 м × 3 мм, неподвижная жидкаяфаза - 5 % SE-30 на диатомитовом носителе, неотмытом кислотой или 10 % OV-17 на диатомитовом носителе; |
| Газ-носитель | азот для хроматографии; |
| Детектор | пламенно-ионизационный; |
| Скорость  газа-носителя | 30 мл /мин; |
| Расход водорода | 30 мл /мин; |
| Расход воздуха | 300 мл /мин; |
| Объем вводимых  растворов | 1 мкл; |
| Температура  детектора | 240 °С |
| Температура  инжектора | 240 °С |
| Температура  колонки | 60 °С |
| Время  хроматографирования | 20 мин. |

Содержание этанола в субстанции (X) в процентах рассчитывают по формуле:



|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S* | **–** | площадь пика этанола на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | **–** | площадь пика этанола на хроматограмме раствора стандартного образца; |
|  | *a*0 | **–** | навеска стандартного образца этанола, г; |
|  | *a* | **–** | *а -* навеска субстанции, г; |
|  | *P* | **–** | содержание основного вещества в стандартном образце этанола, %. |

**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 флавоноидов в пересчете на рутин должно быть не менее 0,5 %.

Приготовление растворов

*Раствор стандартного образца (СО) рутина.* Около 0,05 г (точная навеска) СО рутина, предварительно высушенного при температуре 130-135 °С в течение 3 ч, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 50 мл спирта 70 %, доводят объем раствора тем же растворителем 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 спиртом, прибавляют 9 мл спирта 70 %, 2 мл буферного раствора с рН 4,0 и 6 мл алюминия хлорида раствора 2 % в спирте 70 %, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивают (раствор Б СО рутина). Раствор используют свежеприготовленным.

*Раствор сравнения СО рутина*. 1,0 мл раствора А СО рутина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл спиртом, прибавляют 9 мл спирта 70 %, 2 мл буферного раствора с рН 4,0, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

*Буферный раствор рН 4,0.* 10 мл 1 М раствора натрия гидроксида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 57 мл 1 М раствора уксусной кислоты, объем раствора доводят водой до метки и перемешивают. Срок годности раствора 1 мес.

Около 0,18 г (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 15 мл спирта 70 %, взбалтывают в течение 10 мин, при нагревании на водяной бане при температуре 60 °С. Раствор охлаждают до комнатной температуры и доводят объем раствора спиртом 70 % до метки, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр (раствор А).

10,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл буферного раствора с pH 4,0 и 6 мл алюминия хлорида раствора 2 % в спирте 70 %, объем раствора доводят спиртом 70 % до метки, перемешивают и выдерживают 20 мин при комнатной температуре (испытуемый раствор).

Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения.

Для приготовления раствора сравнения 10 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл буферного раствора с pH 4,0, объем раствора доводят спиртом 70 % до метки.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО рутина в указанных выше условиях относительно раствора сравнения СО рутина.

Содержание суммы флавоноидов в пересчёте на рутин и абсолютно сухое вещество в процентах (*Х*) вычисляют по формуле:



|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *A* | **–** | оптическая плотность испытуемого раствора; |
|  | *S*о | **–** | оптическая плотность раствора Б СО рутина; |
|  | *a*о | **–** | навеска СО рутина, г; |
|  | *a* | **–** | навеска субстанции, г; |
|  | *W* | **–** | потеря в массе при высушивании, %; |
|  | *P* | **–** | содержание основного вещества в СО рутина, %. |

**Хранение.** В защищенном от влаги и света месте при температуре не выше 25 °С.