**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

**МАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

**Клевера трава**  **ФС**

***Trifolii herba* Вводится впервые**

Собранная в фазу цветения и высушенная трава многолетнего травянистого растения дикорастущего клевера лугового (клевера красного) – *Trifolium prаtense* L. и культивируемого клевера посевного – *Trifolium sativum (Schreb.) Crome*, сем. бобовые – *Fabaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

***Внешние признаки.*** *Цельное сырье.* Облиственные, цветоносные верхние части растений. Стебли длиной до 30 см. Листья тройчатые, жесткие. Листочки 2-3 см длиной и 1-1,5 см шириной, обратнояйцевидные, на конце заостренные, по краям мелко или неровно зубчатые с густой сетью боковых утолщенных к краям жилок.

Черешки 4-8 см длиной, на большей части своей длины срастающиеся с прилистниками. Прилистники эллиптические или округлые в верхней части имеющие свободные шиловидные выросты. Окраска прилистников белая с желтоватым оттенком, с сетью зеленых жилок.

Соцветия (головки) округлой формы, состоящие из многочисленных сидячих цветков. Цветки 1,3 – 1,6 см длиной. Каждый цветок состоит из мотылькового венчика и более короткой волосистой чашечки. Чашечка трубчато-колокольчатая, светло-зеленая, зеленовато-коричневая, чаще красноватая, с пятью узкими прямыми зубцами, из которых нижний более длинный. Венчик от светло- до темно-мясокрасного, иногда лиловый.

Запах слабый, характерный. Вкус водного извлечения сладковато-вяжущий.

*Измельченное сырье*. Смесь кусочков стеблей, листьев и цветков различной формы, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет листьев и стеблей серовато-зеленый, цветков – темно-мясокрасный, иногда лиловый.

Запах слабый, характерный. Вкус водного извлечения сладковато-вяжущий.

***Микроскопические признаки.*** *Цельное сырье.* При рассмотрении микропрепарата листа с поверхности должны быть видны клетки эпидермиса с прямыми стенками на верхней стороне листа и клетки эпидермиса с извилистыми стенками на нижней стороне листа. На обеих сторонах встречаются одноклеточные волоски, преобладающие на нижней стороне листа. Базальная клетка волоска короткая, а терминальная длинная с гладкой поверхностью и утолщенной стенкой. Толщина волосков у основания 20 - 40 мкм. Волоски прижаты к поверхности листа. У основания волосков четко выделяются 10 – 12 примыкающих клеток, образующих розетку. Устьица диаметром 20 – 30 мкм, окружены 4 клетками (аномоцитного типа), редкие, преобладающие на нижней стороне листа. В мезофилле листа видны крупные жилки, имеющие кристаллоносную обкладку. Размер кристаллов 10 – 15 мкм.

Клетки эпидермиса чашечки цветка с обеих сторон слегка вытянуты. В клетках паренхимы содержатся многочисленные призматические кристаллы оксалата кальция, образующие кристаллоносную обкладку сосудов. Размер кристаллов 10 – 15 мкм. Вход в трубку чашечки изнутри покрыт 3-4 плотными рядами прижатых, толстостенных, прямых одноклеточных волосков с короткой базальной клеткой. Глубже располагаются редко разбросанные, короткие, головчатые волоски диаметром 20-40 мкм и длиной 40-60 мкм с 3-5 клеточной головкой и 2-3 клеточной ножке. Зубцы чашечки имеют сосочковидные выросты эпидермиса и кристаллоносную обкладку жилки, представленную сростками призматических кристаллов.

*Измельченное сырье.* При рассмотрении микропрепарата должны быть видны фрагменты листовой пластинки с обломанными волосками и отдельными терминальными клетками волосков. Эпидермис фрагментов венчика имеет прямостенные клетки со складчатой кутикулой. Длина эпидермальных клеток 40 – 50 мкм.

|  |  |
| --- | --- |
| ба1 **1** | 2 **1**вба |
| вба3 **1** | ба4 **1** |
|  |  |
|  |  |

Рисунок 1 - Клевера красного трава

1 - Эпидермис верхней стороны листа (280×): а - простой волосок, б - устьица; 2 - Эпидермис нижней стороны листа (280×): а - жилка с кристаллоносной обкладкой, б - место прикрепления волоска, в – устьице. 3 - Эпидермис внутренней части чашечки цветка (280×): а - кристаллоносная паренхима, б - волоски с многоклеточной головкой, в - толстостенные волоски; 4 - Зубец чашечки цветка (280×): а - сосочковидные выросты эпидермиса, б - жилка с кристаллоносной обкладкой;

**Определение основных групп биологически активных веществ**

***Тонкослойная хроматография***

*Приготовление растворов.*

*Раствор стандартного образца (СО) биоханина А.*Около 0,005 г СО биоханина А растворяют в 5 мл спирта 96 % и перемешивают.

Срок годности раствора1 месяц при хранении в защищенном от света месте.

*Приготовление смеси растворителей*. В коническую колбу вместимостью 250 мл последовательно помещают 30 мл ацетонитрила, 5 мл бутанола, 1 мл аммиака водного, перемешивают, добавляют 120 мл хлороформа и снова перемешивают. Смесь растворителей используют свежеприготовленной.

40 мл раствора А, приготовленного для количественного определения, помещают в фарфоровую чашку и выпаривают до объема около 5 мл, к остатку прибавляют 5 мл спирта 96 %. Полученный раствор перемешивают, отстаивают в течение 10 мин и фильтруют через бумажный складчатый фильтр. К фильтрату добавляют 5 мл хлористоводородной кислоты разведенной 10 %, 10 мл воды и нагревают в колбе с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 3 ч. Полученный гидролизат охлаждают, фильтруют через бумажный складчатый фильтр. К фильтрату добавляют 10 мл воды и извлекают агликоны флавоноидных соединений этилацетатом 3 раза по 10 мл. Извлечения объединяют и упаривают на кипящей водяной бане досуха. Сухой остаток растворяют в 5 мл спирта 96 % (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля на алюминиевой подложке с флюоресцентным индикатором размером 10 × 15 см наносят 0,04 мл (40 мкл) испытуемого раствора в виде полосы длиной 10 мм, рядом наносят 0,005 мл (5 мкл) раствора СО биоханина А.

Пластинку с нанесенными пробами высушивают при температуре около 60 °С в течение 5 мин и помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 2-3 ч смесью растворителей хлороформ : ацетонитрил : бутанол : аммиака раствор концентрированный 25 % (120 : 30 : 5 : 1) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет 80 - 90 % от линии старта пластинки, ее вынимают из камеры, высушивают до удаления следов растворителей и просматривают в УФ-свете (254 нм).

На хроматограмме раствора СО биоханина А должна обнаруживаться зона адсорбции серого цвета в нижней трети пластинки. На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции серого цвета на уровне зоны адсорбции СО биоханина А; две зоны адсорбции ниже зоны адсорбции СО биоханина А и одна зона адсорбции выше зоны адсорбции СО биоханина А; допускается обнаружение других зон адсорбции.

***УФ-спектр***. 2 мл раствора А, приготовленного для количественного определения, помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивают (раствор Б).

УФ-спектр раствора Б в области от 230 нм до 360 нм должен иметь максимум поглощения при (260 ± 5) нм и плечо от 310 нм до 330 нм (изофлавоны).

К 5 мл раствора А, приготовленного для количественного определения, прибавляют 0,05 г порошка магния или магниевой стружки и 0,5 мл хлористоводородной кислоты концентрированной; должно наблюдаться постепенно образующееся красное окрашивание (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 2,0 %.

**Кусков корней более 8 см в длину.** *Цельное сырье,* – не более 15 %.

**Кусков корней более 3 см в диаметре.** *Цельное сырье* – не более 15 %.

**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

10 %.

**Посторонние примеси**

***Почерневших и потемневших листьев, выцветших цветков.*** *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 8 %.

***Органической примеси.*** *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 5 %.

***Минеральной примеси.*** *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1,5 %.

**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:* суммы флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 1,0 %; экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 40 % - не менее 20 %.

*Приготовление растворов.*

*Раствор стандартного образца (СО) рутина.* Около 0,05 г (точная навеска) СО рутина 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 (раствора А СО рутина).

Срок годности раствора 1 месяц при хранении в защищенном от света месте.

1,0 мл раствора А СО рутина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 10 мл спирта 96 %, 2 мл алюминия хлорида раствора спиртового 2 %, выдерживают в течение 10 мин, добавляют 0,1 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б СО рутина). Раствор используют свежеприготовленным.

*Раствор сравнения*. 1,0 мл раствора А СО рутина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 0,1 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл спирта 70 %, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Горячее извлечение процеживают через вату в мерную колбу вместимостью 100 мл. Использованную вату помещают в колбу для экстрагирования. Экстракцию повторяют еще дважды в описанных выше условиях, фильтруя извлечения в ту же мерную колбу. После охлаждения объем извлечения доводят спиртом 70 % до метки, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А).

2,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 10 мл спирта 96 %, 2 мл алюминия хлорида раствора спиртового 2 %, выдерживают в течение 10 мин, добавляют 0,1 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (испытуемый раствор).

Через 30 мин измеряют оптическую плотность испытуемого раствора с помощью спектрофотометра при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2,0 мл испытуемого раствора, 0,1 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, доведенные спиртом 96 % в мерной колбе вместимостью 25 мл до метки.

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

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в абсолютно сухом сырье в процентах (Х) вычисляют по формуле:

 А ⋅ ао ⋅ 100 ⋅ 1 ⋅ 25 ⋅ 100 ⋅ Р ⋅ 100 А ⋅ ао ⋅ 50 ⋅ Р

Х = -------------------------------------------- = -----------------------,

 Ао ⋅ а ⋅ 100 ⋅ 2 ⋅ 25 ⋅ 100 ⋅ (100 - W) Ао ⋅ а ⋅ (100 - W)

где А – оптическая плотность испытуемого раствора;

Ао – оптическая плотность раствора СО рутина;

ао – навеска СО рутина, в граммах;

а – навеска сырья, в граммах;

Р – содержание основного вещества в СО рутина, в процентах;

W – влажность сырья, %.

Определение экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 40 %, проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1, экстрагент – спирт 40 %).

**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».