|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Количественное определение производных гидрохинона/арбутина в лекарственном растительном сырье, фармацевтических субстанциях растительного происхождения и лекарственных растительных препаратах** |  | **ОФС**  **Вводится впервые** |

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на методы количественного определения производных гидрохинона/арбутина в лекарственном растительном сырье, фармацевтических субстанциях растительного происхождения и лекарственных растительных препаратах.

Для определения содержания производных гидрохинона/арбутина в лекарственном растительном сырье, фармацевтических субстанциях растительного происхождения и лекарственных растительных препаратах могут быть использованы:

1. титриметрический метод, который заключается в йодометрическом определении гидрохинона, образующегося в результате гидролиза арбутина;

2. спектрофотометрический метод:

2а. метод спектрофотометрии в ультрафиолетовой (УФ-) области спектра, основанный на определении производных гидрохинона в очищенном извлечении;

2б. метод спектрофотометрии в видимой области спектра, основанный на фотометрической реакции производных гидрохинона с аминопиразолоном и калия феррицианидом;

3. метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Спектрофотометрический метод предназначен для определения содержания производных гидрохинона, титриметрический метод и метод ВЭЖХ - для определения содержания арбутина в лекарственном растительном сырье, фармацевтических субстанциях растительного происхождения и лекарственных растительных препаратах. При этом, методы спектрофотометрии в видимой области и ВЭЖХ могут быть использованы для определения содержания производных гидрохинона/арбутина в лекарственных растительных препаратах в лекарственной форме «Сборы».

1. **Титриметрический метод – йодометрия**

***Методика.***

Аналитическую пробу лекарственного растительного сырья/фармацевтической субстанции растительного происхождения/лекарственного растительного препарата измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм.

Около 0,5 г (точная навеска), если иное не указано в фармакопейной статье, измельченного лекарственного растительного сырья/фармацевтической субстанции растительного происхождения/лекарственного растительного препарата помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл воды и нагревают на плитке или другом подходящем устройстве, поддерживая слабое кипение в течение 30 мин при периодическом перемешивании. Горячее извлечение фильтруют через бумажный фильтр диаметром 7 см в мерную колбу вместимостью 100 мл, избегая попадания частиц сырья/субстанции/препарата на фильтр. В колбу с сырьем/субстанцией/препаратом повторно приливают 25 мл воды и кипятят в течение 20 мин. Горячее извлечение вместе с сырьем/субстанцией/препаратом переносят на тот же фильтр и остаток на фильтре дважды промывают горячей водой по 10 мл. К фильтрату прибавляют 3 мл свинца(II) ацетата основного раствора, перемешивают и после охлаждения доводят объем фильтрата водой до метки и снова перемешивают. Колбу помещают в водяную баню и выдерживают около 15 минут до полной коагуляции осадка. Горячую жидкость фильтруют в сухую мерную колбу через бумажный фильтр диаметром 10 см, прикрывая воронку часовым стеклом. После охлаждения к фильтрату прибавляют 1 мл серной кислоты концентрированной, колбу взвешивают с погрешностью ± 0,01 г, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на плитке в течение 1,5 ч, поддерживая равномерное и слабое кипение.

Колбу с содержимым охлаждают, доводят до первоначальной массы водой и жидкость фильтруют через бумажный фильтр диаметром 7 см в сухую колбу. К фильтрату прибавляют 0,1 г цинкового порошка и встряхивают в течение 5 мин. Затем жидкость нейтрализуют по лакмусовой бумаге натрия гидрокарбонатом, прибавляют ещё 2,0 г натрия гидрокарбоната и после его растворения фильтруют в сухую колбу через бумажный фильтр диаметром 7 см.

50,0 мл фильтрата переносят в плоскодонную колбу вместимостью 500 мл, прибавляют 200 мл воды и немедленно титруют из микро– или полумикробюретки 0,1 М раствором йода при встряхивании до появления синего окрашивания, не исчезающего в течение 1 мин (индикатор – крахмал).

Содержание арбутина в пересчете на абсолютно сухое лекарственное растительное сырье/фармацевтическую субстанцию растительного происхождения/лекарственный растительный препарат в процентах (*Х*) вычисляют по формуле:

*V* · 0,02722 · 100 · 100 · 100 *V* · 544,4

*X* *=* ——————————————— *=* —————— ,

*a* · 50 · (100 – *W*) *a* · (100 – *W*)

где: *V* – объем 0,1 М раствора йода, пошедшего на титрование водного извлечения, мл;

0,02722 – количество арбутина, соответствующее 1 мл 0,1 М раствора йода, г;

*a* – навеска лекарственного растительного сырья/фармацевтической субстанции растительного происхождения/лекарственного растительного препарата, г;

*W* – влажность лекарственного растительного сырья/фармацевтической субстанции растительного происхождения/лекарственного растительного препарата, %;

100 – общий объем водного извлечения, мл;

50 – объем водного извлечения, взятого для титрования, мл.

Содержание арбутина в лекарственном растительном сырье, фармацевтической субстанции растительного происхождения и лекарственном растительном препарате должно быть указано в фармакопейной статье.

**2а. Метод спектрофотометрии в УФ**-**области**

*Приготовление растворов.*

*Раствор 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. Полученный раствор охлаждают, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор А СО арбутина). Срок годности раствора 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

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). Раствор используют свежеприготовленным.

***Методика.***

Аналитическую пробу лекарственного растительного сырья/фармацевтической субстанции растительного происхождения/лекарственного растительного препарата измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

Около 0,5 г (точная навеска), если иное не указано в фармакопейной статье, измельченного лекарственного растительного сырья/фармацевтической субстанции растительного происхождения/лекарственного растительного препарата 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/субстанции/препарата 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 (испытуемый раствор А).

Для очистки полученного извлечения от сопутствующих веществ, 3 мл испытуемого раствора А вносят в стеклянную 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 %. Колонку элюируют 15 мл спирта 70 %. Элюат собирают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивают (испытуемый раствор Б).

Оптическую плотность испытуемого раствора Б измеряют на спектрофотометре при длине волны 285 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения. В качестве раствора сравнения используют спирт 70 %, который предварительно пропускают через колонку с алюминия оксидом.

Параллельно в аналогичных условиях измеряют оптическую плотность раствора Б СО арбутина. В качестве раствора сравнения используют спирт 70 %.

Содержание производных гидрохинона в пересчете на арбутин в абсолютно сухом лекарственном растительном сырье/фармацевтической субстанции растительного происхождения/лекарственном растительном препарате в процентах (Х) вычисляют по формуле:

;

где: – оптическая плотность испытуемого раствора Б;

– оптическая плотность раствора Б СО арбутина;

– навеска лекарственного растительного сырья/фармацевтической субстанции растительного происхождения/лекарственного растительного препарата, г;

– навеска СО арбутина, г;

– содержание основного вещества в СО арбутина, %;

– влажность лекарственного растительного сырья/фармацевтической субстанции растительного происхождения/лекарственного растительного препарата, %.

Допускается содержание производных гидрохинона в пересчете арбутин в лекарственном растительном сырье/фармацевтической субстанции растительного происхождения/лекарственном растительном препарате вычислять с использованием удельного показателя поглощения по формуле:

;

где: – оптическая плотность испытуемого раствора Б;

– удельный показатель поглощения арбутина при длине волны 285 нм, равный 72;

– навеска лекарственного растительного сырья/фармацевтической субстанции растительного происхождения/лекарственного растительного препарата, г;

– влажность лекарственного растительного сырья/фармацевтической субстанции растительного происхождения/лекарственного растительного препарата, %.

Содержание производных гидрохинона в пересчете на арбутин в лекарственном растительном сырье, фармацевтической субстанции растительного происхождения и лекарственном растительном препарате должно быть указано в фармакопейной статье.

**2б. Метод спектрофотометрии в видимой области**

*Приготовление растворов*

*Аминопиразолона раствор 2 %.* 0,5 г аминопиразолона (4-аминоантипирина) растворяют в воде, доводят объем раствора водой до 25 мл и перемешивают. Срок годности раствора не более 1 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

*Калия феррицианида раствор 8 %.* 8 г калия феррицианида растворяют в воде, доводят объем раствора водой до 100 мл и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

*Раствор стандартного образца (СО) арбутина.* Около 0,05 г (точная навеска) СО арбутина помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл воды и растворяют при перемешивании. Затем доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (раствор А СО арбутина). Раствор используют свежеприготовленным.

5,0 мл раствора А СО арбутина переносят в делительную воронку вместимостью 100 мл, в которую затем добавляют последовательно, каждый раз перемешивая, 45 мл воды, 1 мл аминопиразолона раствора 2 %, 0,5 мл аммиака раствора разведённого 3,4 % и 1 мл калия феррицианида раствора 8 %. Оставляют на 5 мин, затем добавляют 25 мл дихлорметана и встряхивают. После расслоения нижний (дихлорметановый) слой фильтруют через воронку с плотным ватным тампоном, предварительно смоченным дихлорметаном, в мерную колбу вместимостью 100 мл. Операцию повторяют еще трижды, каждый раз добавляя в делительную воронку 25 мл дихлорметана. Содержимое мерной колбы доводят дихлорметаном до метки и перемешивают (раствор Б СО арбутина). Раствор используют свежеприготовленным.

***Методика.***

Аналитическую пробу лекарственного растительного сырья/фармацевтической субстанции растительного происхождения/лекарственного растительного препарата измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

Около 1,0 г (точная навеска), если иное не указано в фармакопейной статье, измельченного лекарственного растительного сырья/фармацевтической субстанции растительного происхождения/лекарственного растительного препарата помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл воды и кипятят с обратным холодильником на плитке или другом подходящем устройстве в течение 30 мин. После охлаждения содержимое колбы с помощью воды количественно переносят в мерную колбу вместимостью 250 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Оставляют до осаждения частиц сырья/субстанции / препарата и 5,0 мл отстоявшегося извлечения переносят в делительную воронку вместимостью 100 мл, в которую затем добавляют последовательно, каждый раз перемешивая, 45 мл воды, 1 мл аминопиразолона раствора 2 %, 0,5 мл аммиака раствора разведённого 3,4 % и 1 мл калия феррицианида раствора 8 %. Оставляют на 5 мин, затем добавляют 25 мл дихлорметана и встряхивают. После расслоения нижний (дихлорметановый) слой фильтруют через воронку с плотным ватным тампоном, предварительно смоченным дихлорметаном, в мерную колбу вместимостью 100 мл. Операцию повторяют еще трижды, каждый раз добавляя в делительную воронку 25 мл дихлорметана. Содержимое мерной колбы доводят дихлорметаном до метки и перемешивают (испытуемый раствор).

Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 457 ± 3 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения. В качестве раствора сравнения используют дихлорметан.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО арбутина в аналогичных условиях.

Содержание производных гидрохинона в пересчете на арбутин в абсолютно сухом лекарственном растительном сырье/фармацевтической субстанции растительного происхождения/лекарственном растительном препарате в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

где: – оптическая плотность испытуемого раствора;

– оптическая плотность раствора Б СО арбутина;

– навеска лекарственного растительного сырья/фармацевтической субстанции растительного происхождения/лекарственного растительного препарата, г;

– навеска СО арбутина, г;

– содержание основного вещества в СО арбутина, %;

– влажность лекарственного растительного сырья/фармацевтической субстанции растительного происхождения/лекарственного растительного препарата, %.

Допускается содержание производных гидрохинона в пересчете на арбутин в лекарственном растительном сырье/фармацевтической субстанции растительного происхождения/лекарственном растительном препарате вычислять с использованием удельного показателя поглощения по формуле:

где: *A –* оптическая плотность испытуемого раствора;

*–* удельный показатель поглощения продуктов реакции арбутина с аминопиразолоном и калия феррицианидином при длине волны 459 нм, равный 648;

*а  –* навеска лекарственного растительного сырья/фармацевтической субстанции растительного происхождения/лекарственного растительного препарата, г;

*W –* влажность лекарственного растительного сырья/фармацевтической субстанции растительного происхождения/лекарственного растительного препарата, %.

Содержание производных гидрохинона в пересчете на арбутин в лекарственном растительном сырье, фармацевтической субстанции растительного происхождения и лекарственном растительном препарате должно быть указано в фармакопейной статье.

**Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии**

*Приготовление растворов.*

*Раствор аммония формиата 0,063 %.* Около 0,630 г (точная навеска) аммония формиата помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, прибавляют 500 мл воды, перемешивают. Объем раствора доводят водой до метки и перемешивают.

*Раствор стандартного образца (СО) арбутина.* Около 0,1 г (точная навеска) СО арбутина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в спирте 40 %, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (раствор А). Раствор А используют свежеприготовленным.

1,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, объем раствора доводят спиртом 40 % до метки и перемешивают (раствор Б). Раствор Б используют свежеприготовленным.

*Проверка пригодности хроматографической системы (ППХС).*

Хроматографическая система считается пригодной, если для хроматограммы раствора Б СО арбутина выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по основному пику, должна быть не менее 3000 теоретических тарелок;

- фактор асимметрии основного пика должен быть не менее 0,8 и не более 1,5;

- относительное стандартное отклонение площади пика, рассчитанное по 5 повторным хроматограммам, должно быть не более 4 %.

***Методика.***

Аналитическую пробу лекарственного растительного сырья/фармацевтической субстанции растительного происхождения и лекарственного растительного препарата измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм.

Около 1,0 г (точная навеска), если иное не указано в фармакопейной статье, измельченного лекарственного растительного сырья/фармацевтической субстанции растительного происхождения/лекарственного растительного препарата помещают в плоскодонную колбу с притертой пробкой вместимостью 250 мл, прибавляют 110 мл экстрагента (для толокнянки обыкновенной листьев и лекарственных растительных препаратов на её основе – спирт 40 %, для брусники обыкновенной листьев и лекарственных растительных препаратов на её основе – вода) и нагревают на водяной бане с обратным холодильником в течение 60 мин. Колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры и фильтруют извлечение через пять слоев марли в мерную колбу вместимостью 250 мл.

Объем полученного извлечения доводят соответствующим экстрагентом до метки и перемешивают. 10,0 мл полученного извлечения фильтруют через нейлоновый мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм (раствор А). 2,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят спиртом 40 % до метки и перемешивают (испытуемый раствор).

20 мкл раствора СО арбутина и 20 мкл испытуемого раствора хроматографируют попеременно, получая не менее 5 хроматограмм для раствора СО и не менее 3 хроматограмм для испытуемого раствора в ниже приведенных условиях.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка  Температура колонки | 250 × 4,6 мм, силикагель октадецилсилил эндкепированный (С18) для хроматографии, 5 мкм;  30 °С; |
| Подвижная фаза | ПФ А: 0,063 % раствор формиата аммония;  ПФ Б: ацетонитрил; |
| Способ элюирования | Программа градиента:   |  |  |  | | --- | --- | --- | | Время, мин | ПФ А, % | ПФ Б, % | | 0,0 | 90 | 10 | | 3,0 | 90 | 10 | | 10,0 | 10 | 90 | | 15,0 | 10 | 90 | | 15,1 | 90 | 10 | | 20,0 | 90 | 10 | |
| Скорость подвижной фазы, мл/мин | 0,5 |
| Детектор | спектрофотометрический или диодная матрица; |
| Длина волны | 280 нм |
| Объем вводимой  пробы, мкл | 10 |
| Время  хроматографирования | 20 мин. |

Время удерживания арбутина около 6 мин.

Содержание арбутина в абсолютно сухом лекарственном растительном сырье/фармацевтической субстанции растительного происхождения/лекарственном растительном препарате в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

где: *S*– площадь пика арбутина на хроматограмме испытуемого раствора;

*Sо*– площадь пика арбутина на хроматограмме раствора СО арбутина;

*ао*– навеска СО арбутина, г;

*а* – навеска лекарственного растительного сырья/фармацевтической субстанции растительного происхождения/лекарственного растительного препарата, г;

*Р* – содержание основного вещества в СО арбутина, в %;

*W* – влажность лекарственного растительного сырья/фармацевтической субстанции растительного происхождения/лекарственного растительного препарата, в %.

Содержание арбутина в лекарственном растительном сырье, фармацевтической субстанции растительного происхождения и лекарственном растительном препарате должно быть указано в фармакопейной статье.