**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**НИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |  |
| --- | --- |
| **Зверобоя трава измельченная и порошок для приготовления настоя** | **ФС** |
| ***Hyperici herba concisi /pulvis ad infusum*** | **Вводится впервые** |

Настоящая фармакопейная статья распространяется на cобранную в фазу цветения и высушенную траву дикорастущего и культивируемого многолетнего растения зверобоя продырявленного *Hypericum perforatum* L., и зверобоя пятнистого (зверобоя четырехгранного) *Hypericum maculatum* Crantz (*H. quadrangulum* L.), сем. зверобойных – *Hypericaceae*, применяемую в качестве лекарственного растительного препарата.

ПОДЛИННОСТЬ

***Внешние признаки.*** *Измельченный препарат.* Различной формы кусочки стеблей, листьев, цветков, недозрелые плоды и их части, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.

При рассмотрении измельченного препарата 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 от серовато- или желтовато-зеленого до темно-зеленого, с зеленовато-желтыми, желтыми, зеленовато-коричневыми, редко – розовато-фиолетовыми и коричневыми вкраплениями. Запах слабый, характерный.

*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 от серовато-зеленого до темно-зеленого и зеленовато-коричневого с многочисленными белыми, желтовато-белыми, желтыми и коричневыми вкраплениями. Запах слабый, характерный.

***Микроскопические признаки.***

Анализ проводят в соответствии с требованиями ОФС «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов («Травы»)».

*Измельченный препарат.* 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 препарата, 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) с четковидным утолщением стенок клеток (200×),
3 – фрагмент эпидермиса стебля: четковидные утолщения стенок клеток и устьица анизоцитного типа (200×), 4 – фрагмент мезофилла чашелистика: вытянутые вместилища с 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 раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около 1,0 г препарата, измельченного 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 1 ч 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 обрабатывают дифенилборной 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 адсорбции оранжевого или желтого цвета, выше нее зона адсорбции голубого 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 препарата, 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.** *Измельченный препарат, порошок* – не более
13 %. В соответствии с требованиями ОФС "Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов".

**Зола общая.** *Измельченный препарат, порошок* – не более
8 %. В соответствии с требованиями ОФС "Зола общая".

**Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте.** *Измельченный препарат, порошок* – не более 1 %. В соответствии с требованиями ОФС "Зола, нерастворимая в хлористоводородная".

**Измельченность препарата.** *Измельченный препарат:* 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 %.

В соответствии с требованиями ОФС "Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах".

**Допустимые примеси**

В соответствии с требованиями ОФС "Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах".

***Частиц, изменивших окраску (потемневших и почерневших).*** *Измельченный препарат* – не более 3 %.

***Стебли (в том числе отделенные при анализе).*** *Измельченный препарат* – не более 50 %.

***Органическая примесь***. *Измельченный препарат* – не более 1 %.

***Минеральная примесь.*** *Измельченный препарат, 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».

**Зараженность вредителями запасов.** В соответствии с требованиями ОФС «Определение степени зараженности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов вредителями запасов».

**Масса содержимого упаковки.** В соответствии с требованиями ОФС «Отбор проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов".

**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.** *Измельченный препарат, порошок:* сумма флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 1,5 %.

*Приготовление растворов.*

*Раствор СО рутина.* Около 0,05 г (точная навеска) СО рутина 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 препарата измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного препарата 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 препарата со стенок. Горячее извлечение фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл так, чтобы частицы препарата 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 (испытуемый раствор А).

1,0 мл испытуемого раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл алюминия хлорида раствора 2 % в спирте 96 %, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (испытуемый раствор Б).

Оптическую плотность испытуемого раствора Б измеряют через 40 мин 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 1 мл испытуемого раствора А 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 тех 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 препарате в процентах (*Х*) вычисляют по формуле:

$X= \frac{A ∙ a\_{0 }∙ 100 ∙ 1 ∙ 25 ∙ 100 ∙ 100 ∙ P}{A\_{0 }∙ a ∙ 100 ∙ 25 ∙ 1 ∙ 100 ∙ \left(100 - W\right)}= \frac{A ∙ a\_{0 }∙ P ∙ 100 }{A\_{0 }∙ a ∙ \left(100 - W\right)}$,

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *A* | – | оптическая плотность испытуемого раствора Б; |
|  | *Aо* | – | оптическая плотность раствора Б СО рутина; |
|  | *а* | – | навеска препарата, г; |
|  | *ао* | – | навеска СО рутина, г; |
|  | *P* | – | содержание основного вещества в СО рутина, %; |
|  | *W* | – | влажность препарата, %. |

Допускается содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин вычислять с использованием удельного показателя поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом по формуле:

$$X= \frac{A ∙100 ∙25 ∙100}{A\_{1см}^{1\%} ∙a ∙1 ∙(100-W)}=\frac{A ∙250000}{A\_{1см}^{1\%} ∙a ∙(100-W)},$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *A* | – | оптическая плотность испытуемого раствора Б; |
|  | $$A\_{1см}^{1\%}$$ | – | удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при длине волны 415 нм, равный 248; |
|  | *а* | – | навеска препарата, г; |
|  | *W* | – | влажность препарата, %. |

**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».