**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |  |
| --- | --- |
| **Первоцвета корневищ с корнями экстракт жидкий+Тимьяна обыкновенного травы экстракт, cироп** |  **ФС** |
| ***Primulae radicum extractum fluidum+Thymi vulgaris herbae extractum fluidum, sirupus*** | **Вводится впервые** |

Настоящая фармакопейная статья распространяется на лекарственный препарат Первоцвета корневищ с корнями экстракт жидкий+Тимьяна обыкновенного травы экстракт жидкий, сироп, в качестве вспомогательных веществ содержит левоментол, метилпарагидроксибензоат и сахарозу. Препарат должен соответствовать требованиям ОФС «Сиропы» и ниже приведенным требованиям.

Содержит тимола не менее 3,0 мг и суммы примуловых кислот не менее 20,0 мг в 100,0 г сиропа.

**Описание**. Густая жидкость коричневого цвета с характерным запахом.

**\***Допускается наличие опалесценции.

**Подлинность**

***Тонкослойная хроматография***

***1. Тимьяна обыкновенного травы экстракт (тимол)***

*Приготовление растворов*

*Подвижная фаза (ПФ).* толуол - этилацетат (93:7).

*Испытуемый раствор.* 5,0 мл препарата помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в 7 мл воды, доводят объём раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. 5,0 мл полученного раствора пропускают через колонку для твердофазной экстракции. Колонку промывают 4 раза по 2,5 мл смеси вода-метанол (9:1) под давлением. Осадок на колонке промывают 1,0 мл метанола без давления (или при минимальном давлении только в начале и в конце промывки). Используют элюат.

*Подготовка колонки для твердофазной экстракции.* Силикагель октадецилсилильным эндкепированный для колоночной хроматографии (С18), 55-105 мкм, 200 мг/3 мл, 50 р/K). Перед использованием колонку 2 раза ополаскивают 2 мл метанола и затем 2 раза по 2 мл смеси вода-метанол (9:1).

*Раствор стандартного образца (СО) тимола.* 3 мг СО тимола 3 растворяют в 25 мл метанола.

Срок годности раствора не более 1 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

*Раствор для детектирования*. Анисового альдегида раствор уксуснокислый в метаноле.

На линию старта ТСХ пластинки со слоем силикагеля F254в виде полос длиной 10 мм и шириной не более 2 мм наносят по 5 мкл испытуемого раствора и раствора СО тимола. Пластинку с нанесенными пробами сушат в течение 5 мин, помещают в камеру, предварительно насыщенную смесью растворителей толуол - этилацетат (93:7) в течение не менее 1 ч, 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. Пластинку выдерживают при температуре 100-105 °С в течение 5 мин до появления зон адсорбции.

На хроматограмме раствора СО тимола должна обнаруживаться оранжево-красная зона адсорбции.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться зона адсорбции оранжево-красного цвета на уровне зоны адсорбции раствора СО тимола; допускается обнаружение других зон адсорбции.

***2. Первоцвета корневищ с корнями экстракт (примуловые кислоты)***

Зона адсорбции на хроматограмме испытуемого раствора, полученного для количественного определения примуловых кислот, по положению и цвету должна соответствовать зоне адсорбции раствора СО примуловой кислоты 1.

**Плотность.** От 1,230 до 1,270 г/см3. В соответствии с требованиями ОФС «Плотность».

**рН.** От 4,0 до 6,0. В соответствии с требованиями ОФС «Ионометрия». Определение проводят непосредственно в препарате.

**Масса содержимого упаковки**. В соответствии с требованиями ОФС «Масса (объём) содержимого упаковки».

**Микробиологическая чистота.** В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

**Количественное определение**

***Тимол.*** Определение проводят методом газовой хроматографии.

*Приготовление растворов*

*Испытуемый раствор.* Около 20,0 г препарата (точная навеска) помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 10 мл воды, затем количественно переносят в делительную воронку вместимостью 500 мл, промывая коническую колбу 4-5 раз по 20-25 мл хлороформа. Хлороформ прибавляют в делительную воронку по стенке, избегая вспенивая.

 В ту же делительную воронку прибавляют 1,0 мл раствора внутреннего стандарта. Экстрагируют медленно, совершая движения в одну сторону (при быстрой экстракции фазы могут не разделиться) в течение 5 мин. Хлороформную фазу отделяют и фильтруют через бумажный фильтр «черная лента» с 14 г натрия сульфата безводного, предварительно смоченные хлороформом, в круглодонную колбу вместимостью 500 мл. Фильтр промывают хлороформом. Экстракцию повторяют 2 раза по 70 мл хлороформа, смачивая бумажный фильтр хлороформом до и после каждого фильтрования. Промывают фильтровальную бумагу 15 мл хлороформа и соединяют все хлороформные фазы.

 Объединённые хлороформные фазы выпаривают на роторном испарителе при температуре не более 40 °С досуха. Круглодонную колбу закрывают, охлаждают, осадок растворяют в хлороформе и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл (стенки колбы ополаскивают 3-4 раза хлороформом), доводят объём раствора хлороформом до метки и перемешивают.

*Раствор внутреннего стандарта.* Около 66 мг (точная навеска) стандартного образца (СО) камфоры помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 20 мл хлороформа, доводят объём раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

*Раствор плацебо.* 31,7 г (точная навеска) плацебо (все составляющие препарата, кроме первоцвета корней экстракта жидкого, тимьяна травы экстракта жидкого и левоментола) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 25 мл воды, доводят объём раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

*Стандартный раствор 1.* Около 14 мг (точная навеска) стандартного образца (СО) карвакрола и около 7,6 мг (точная навеска) СО тимола помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в 5 мл хлороформа, доводят объём раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

*Стандартный раствор 2.* 20,0 мл раствора плацебо помещают в делительную воронку вместимостью 250 мл, прибавляют 10 мл воды и, по стенке делительной воронки, во избежание вспенивая, прибавляют 100 мл хлороформа. 1,0 мл стандартного раствора 1 и 1,0 мл раствора внутреннего стандарта помещают в ту же делительную воронку, экстрагируют, перемешивая в течение 5 мин, и далее раствор готовят аналогично приготовлению испытуемого раствора.

*Контрольный раствор*. 20,0 мл раствора плацебо помещают в делительную воронку вместимостью 250 мл, прибавляют 10 мл воды по стенке делительной воронки, во избежание вспенивая, прибавляют 100 мл хлороформа, экстрагируют, перемешивая в течение 5 мин, и далее раствор готовят аналогично приготовлению испытуемого раствора.

*Условия хроматографирования*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка капиллярная | 60 м × 0,25 мм, Макрогол 2000, 0,25 мкм |
| Газ-носитель  | гелий |
| Скорость газа-носителя мл/мин | 1,5 |
| Детектор | пламенно-ионизационный |
| Деление потока | 5:1 |
| Время анализа, мин | 50 |
| Объем вводимой пробы, мкл | 2 |
| Температура, °C | колонка | 0 мин0-10 мин10 - 20 мин20-30 мин30-34,5 мин34,5-49,5 мин | 606060 → 80 (2°С/ мин)8080 → 260 (40°С/ мин)260 |
|  |  |
|  | инжектор |  | 220 |
|  | детектор |  | 220 |

Хроматографируют испытуемый раствор, контрольный раствор и стандартный раствор 2.

*Проверка пригодности хроматографической системы.* Хроматографическая система считается пригодной, если для хроматограммы стандартного раствора 2 выполняются следующие условия:

- *разрешение (RS)* между пиками тимола и пиком карвакрола должно быть не менее 2,0;

- *фактор асимметрии (AS)* пиков тимола, камфоры и карвакрола должны быть не более 2,0 %;

- *относительное* *стандартное отклонение* *(RSD)* площади пика тимола к площади пика внутреннего стандарта должно быть не более 2,0 % (6 введений);

- *эффективность хроматографической колонки (N)*, рассчитанная для каждого пика: тимол, камфора и карвакрол, быть не менее 3000 теоретических тарелок.

Относительные времена удерживания пиков: тимол - 1 (около 38 мин), камфора – около 0,9; карвакрол – около 1,01.

Содержания тимола в мг/100 г препарата (*Х*) вычисляют по формуле:

*Х*= $\frac{S\_{t}∙S\_{k}^{0}∙a\_{0} ∙ P∙ 10 ∙ 100 }{S\_{k} ∙S\_{t}^{0} ∙ a ∙ 10 ∙ 10 ∙ 100}=\frac{S\_{t}∙S\_{k}^{0}∙a\_{0} ∙ P }{S\_{k} ∙S\_{t}^{0} ∙ a ∙ 10 }$,

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | $S\_{t}^{0}$  | − | площадь пика тимола на хроматограмме стандартного раствора 2; |
|  | *St*  | − | площадь пика тимола на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | $$S\_{k}^{0}$$ | − | площадь пика камфоры на хроматограмме стандартного раствора 2; |
|  | *Sk*  | − | площадь пика тимола на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *a0* | – | масса стандартного образца тимола, мг; |
|  | *a* | – | навеска препарата, г |
|  | *P* | – | фактическое содержание основного вещества в тимоле, %. |

***Примуловые кислоты.*** Определение проводят методом тонкослойной хроматографии с последующей денситометрией.

*Приготовление растворов*

*Пластинка.* ВЭТСХ пластинка со слоем силикагеля F254, 20 см × 10 см

*Подвижная фаза (ПФ).* Этилацетат – муравьиная кислота – вода (50:10:10).

*Испытуемый раствор.* Около 5,0 г (точная навеска) препарата помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 15 мл воды, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают. 2,0 мл полученного раствора пропускают через колонку для твердофазной экстракции. Затем колонку промывают 4 раза по 2,5 мл смеси вода-метанол (9:1) при пониженном давлением. Смывы отбрасывают. Осадок на колонке промывают 4,0 мл метанола в колбу, не используя пониженное давление (пониженное давление применяют только в начале и в конце промывки). Используют элюат.

*Подготовка колонки для твердофазной экстракции.* Силикагель октадецилсилильным для колоночной хроматографии (С18), 55-105 мкм, 200 мг/3 мл, 50 р/K). Перед использованием колонку 2 раза ополаскивают 2 мл метанола и затем 2 раза по 2 мл смеси вода-метанол (9:1).

*Раствор стандартного образца (СО) примуловой кислоты 1.* 2,5 мг стандартного образца примуловой кислоты 1 помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в 4 мл метанола, доводят объём раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

1,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объём раствора метанолом до метки и перемешивают.

*Раствор для детектирования* *1.* 5 мл серной кислоты концентрированной смешивают со 100 мл этанола.

*Раствор для детектирования* *2.* 1 г ванилина смешивают со 100 мл этанола.

На линию старта высокоэффективной хроматографической пластинки на расстоянии 1,5 см от нижнего края пластинки полосами длиной 8 мм, расстояние между полосами 5 мм, скорость нанесения 3 сек/мкл наносят испытуемый раствор и раствор СО примуловой кислоты попеременно (14 нанесений на одной пластинке: 8 раз раствор СО примуловой кислоты и 6 раз испытуемый раствор) (таблица).

Таблица

Порядок нанесения испытуемого раствора и раствора СО примуловой кислоты 1.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Раствор СО примуловой кислоты | Испытуемый раствор | Раствор СО примуловой кислоты | Испытуемый раствор | Раствор СО примуловой кислоты | Испытуемый раствор | Раствор СО примуловой кислоты | Раствор СО примуловой кислоты | Испытуемый раствор | Раствор СО примуловой кислоты | Испытуемый раствор | Раствор СО примуловой кислоты | Испытуемый раствор | Раствор СО примуловой кислоты |
| 7 мкл | 10 мкл | 9 мкл | 10 мкл | 11 мкл | 10 мкл | 13 мкл | 7 мкл | 10 мкл | 9 мкл | 10 мкл | 11 мкл | 10 мкл | 13 мкл |
| 0,175мкг |  | 0,225мкг |  | 0,275мкг |  | 0,325мкг | 0,175мкг |  | 0,225мкг |  | 0,275мкг |  | 0,325мкг |

Пластинку с нанесенными пробами сушат в течение 5 мин, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 1 ч подвижной фазой этилацетат – муравьиная кислота – вода (50:10:10), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет 7,5 см от линии старта, пластину вынимают из камеры, высушивают при температуре 70 °С и еще горячую обрабатывают раствором для детектирования 1, затем раствором для детектирования 2. Пластинку нагревают при температуре 110 °С в течение 10 мин.

На хроматограмме раствора СО примуловой кислоты 1 в нижней трети пластинки должны обнаруживаться интенсивная зона адсорбции синевато-фиолетового цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться зона адсорбции синевато-фиолетового цвета на уровне зоны адсорбции примуловой кислоты 1; допускается обнаружение зоны адсорбции синевато-фиолетового цвета ниже зоны адсорбции примуловой кислоты 1 (примуловая кислота 2); допускается обнаружение других зон адсорбции.

Сухую пластинку регистрируют на денситометре при длине волны 540 нм (вольфрамовая или дейтерий-волфрамовая лампа), щелевые размер 6,00 мм× 0,20 мм, скорость сканирования 10 мм/с, разрешение данных 100 м/шаг. Площади пиков просматривают в режиме интегрирования.

Уравнение калибровочной кривой для примуловой кислоты 1:

$$S=ax+b,$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S* | − | средняя площадь пика компонента; |
|  | *x* | − | масса компонента/зона адсорбции, мкг; |
|  | *a* | − | наклон калибровочной кривой; |
|  | *b* | − | пересечение калибровочной кривой. |

Массу примуловой кислоты 1/зона адсорбции испытуемого раствора (*Xp1*) в мкг вычисляют по формуле:

$$X\_{p1}=\frac{S\_{p1}-b}{a} (для проверки показания денситометра),$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | $$S\_{p1}$$ | − | площадь зоны адсорбции примуловой кислоты 1 испытуемого раствора; |
|  | *a* | − | наклон калибровочной кривой для примуловой кислоты 1; |
|  | *b* | − | пересечение калибровочной кривой для примуловой кислоты 1. |

Содержание примуловой кислоты 1 в мг/100 г препарата (*Х1*) вычисляют по формуле:

$$X\_{1}=\frac{X\_{p1}∙4∙10∙100∙1000∙25}{a∙10∙10∙1000∙2} ,$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | $$X\_{p1}$$ | − | масса примуловой кислоты 1/зона адсорбции испытуемого раствора по показанию денситометра, мкг; |
|  | *a* | − | навеска препарата, взятого для приготовления испытуемого раствора, г. |

Если на хроматограмме испытуемого раствора обнаруживается зона адсорбции, соответствующая примуловой кислоте 2, производят ее оценку относительно калибровочной функции примуловой кислоты 1. По шести измерениям вычисляют среднюю площадь пика примуловой кислоты 2 и подставляют в уравнение калибровочной кривой для примуловой кислоты 1.

Массу примуловой кислоты 2/зона адсорбции испытуемого раствора (*Хр2*) вычисляют о формуле:

$$X\_{p2}=\frac{S\_{p2}-b}{a} (для проверки показания денситометра),$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | $$S\_{p2}$$ | − | площадь зоны адсорбции примуловой кислоты 2 испытуемого раствора; |
|  | *a* | − | наклон калибровочной кривой для примуловой кислоты 1; |
|  | *b* | − | пересечение калибровочной кривой для примуловой кислоты 1. |

Содержание примуловой кислоты 2 в мг/100 г препарата (*Х2*) вычисляют по формуле:

$$X\_{1}=\frac{X\_{p2}∙4∙10∙100∙1,11∙1000∙25}{a∙10∙10∙1000∙2} ,$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | $$X\_{p2}$$ | − | масса примуловой кислоты 2/зона адсорбции испытуемого раствора по показанию денситометра, мкг; |
|  | *a* | − | навеска препарата, взятого для приготовления испытуемого раствора, г. |

Если содержание примуловой кислоты 1 и примуловой кислоты 2 на пластинке составляет более 500 мкг, испытуемый раствор необходимо разбавить.

Содержание суммы примуловых кислот в мг/100 г препарата (Х) вычисляют по формуле:

$$X=X\_{p1}+X\_{p2}$$

**Хранение**. В соответствие с требованиями ОФС «Хранение лекарственных средств».