МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Толокнянки обыкновенной листья** |  | **ФС.2.5.0099** |
| **Arctostaphylos uvae-ursi folia** |  | **Взамен ФС.2.5.0099.18** |

|  |
| --- |
|  |

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Собранные весной до и в начале цветения или осенью с начала созревания плодов до появления снежного покрова, высушенные листья дикорастущего вечнозелёного кустарничка толокнянки обыкновенной – *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) *Spreng.*, семейства вересковых– *Ericaceae.*

Содержит:

- не менее 7,0 % суммы фенологликозидов в пересчёте на арбутин в сухом сырье (ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях»);

- или не менее 7,0 % арбутина в пересчёте на сухое сырьё (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

***Внешние признаки*.** Определение проводят в соответствии с ОФС «Листья».

*Цельное сырьё.* Смесь цельных или частично измельчённых листьев. Листья мелкие, кожистые, ломкие, обратно-яйцевидной или удлинённо-овальной формы, иногда с небольшой выемкой, на верхушке закруглённые, к основанию клиновидно-суженные, с очень коротким черешком. Длина листьев 1–2,2 см, ширина 0,5–1,2 см. Жилкование сетчатое. При рассмотрении под лупой (10× и др.) на верхней поверхности листа жилки заметно вдавлены. Черешки листьев в поперечном сечении округло-треугольной формы.

Листья с верхней стороны тёмно-зелёные, блестящие, с нижней стороны немного светлее, матовые, голые. Запах отсутствует.

*Измельчённое сырьё.* Кусочки листьев различной формы и черешков, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 3 мм. При рассмотрении под лупой (10×) видны кусочки листьев различной формы, на верхней поверхности жилки вдавлены; кусочки черешков, редко-тонких стеблей.

Цвет от светло-зелёного до тёмно-зелёного с коричневато-зелёными, светло-коричневыми, коричневыми, редко фиолетовыми и желтовато-белыми вкраплениями. Запах отсутствует.

*Порошок.* Кусочки листьев и черешков, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. При рассмотрении под лупой (10×) видны кусочки листьев с вдавленными жилками на верхней поверхности листа; кусочки черешков, редко-тонких стеблей.

Цвет от светло-зелёного до тёмно-зелёного с коричневато-зелёными, светло-коричневыми, коричневыми, редко фиолетовыми и желтовато-белыми вкраплениями. Запах отсутствует.

***Микроскопические признаки*.** Определение проводят в соответствии с ОФС «Микроскопический и микрохимический анализ лекарственного растительного сырья и лекарственных средств растительного происхождения».

*Цельное сырьё, измельчённое сырьё.* При рассмотрении микропрепарата листа с поверхности должны быть видны: многоугольные клетки верхнего и нижнего эпидермиса с прямыми и довольно толстыми стенками; устьица крупные, округлые, с широко раскрытой устьичной щелью, окружены 8 (5–9) клетками эпидермиса (аномоцитный тип), расположенные на нижнем эпидермисе; вдоль крупных жилок располагаются кристаллы оксалата кальция в виде призм, их сростков и друз.

Волоски редкие, изогнутые, 2–3-клеточные, встречаются у основания листа и на черешке.

Клетки эпидермиса черешка толстостенные, прозенхимной формы. Эпидермис опушён многочисленными 2–3 клеточными волосками. Под эпидермисом в три-четыре слоя залегает колленхима.

Проводящая система черешка представлена одним крупным коллатеральным пучком, расположенным в центре.

*Порошок*. При рассмотрении микропрепарата порошка должны быть видны фрагменты многоугольных клеток эпидермиса с прямыми и довольно толстыми стенками, устьица с 8 (5–9) околоустьичными клетками, с широко раскрытой устьичной щелью (аномоцитный тип); фрагменты волосков простых, слегка изогнутых, 2–3-клеточных. На фрагментах листьев в мезофилле должны быть видны редкие одиночные кристаллы оксалата кальция в виде призм, их сростков и друз. В микропрепарате также обнаруживаются фрагменты черешка листа.



Рисунок – Толокнянки обыкновенной листья

1 – фрагмент верхнего эпидермиса листа (400×); 2 – фрагмент нижнего эпидермиса листа с устьицами (аномоцитный тип) (400×); 3 – фрагмент эпидермиса листа вдоль жилки с кристаллами оксалата кальция в виде призм (400×); 4 – фрагмент мезофилла листа с кристаллами оксалата кальция в виде призм, их сростков и друз (400×); 5 – поперечный срез листа (100×); 6 – поперечный срез черешка (40×);7 – фрагмент эпидермиса черешка (400×); 8 – фрагмент эпидермиса черешка с 2-клеточным изогнутым волоском (400×).

***Определение основных групп биологически активных веществ***

*Тонкослойная хроматография.* Определение проводят методом ТСХ (ОФС «Тонкослойная хроматография»).

*Пластинка*. ТСХ пластинка со слоем силикагеля.

*Подвижная фаза (ПФ)*. Вода––муравьиная кислота безводная––этилацетат 6:6:88.

*Испытуемый раствор.* Полученного для количественного определения арбутина 10 мл исходного раствора пропускают через колонку с алюминия оксидом нейтральным для хроматографии и используют для хроматографирования.

*Раствор стандартного образца арбутина*. Растворяют 10 мг арбутина в 10 мл спирта 70 % при нагревании на водяной бане.

*Реактив для детектирования*. Фосфорномолибденовой кислоты спиртовой раствор 10 %.

На линию старта пластинки полосами длиной 10 мм и шириной 2 мм наносят 60 мкл испытуемого раствора и 10 мкл раствора стандартного образца арбутина. Пластинку с нанесёнными пробами сушат на воздухе в течение 5 мин, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин ПФ, и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт ПФ пройдёт около 80–90  % длины пластинки от линии старта, её вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей. Пластинку опрыскивают реактивом для детектирования, выдерживают при температуре 100–105 °С в течение 3–10 мин и просматривают при дневном свете.

*Результат*

На хроматограмме раствора стандартного образца арбутина должна обнаруживаться зона адсорбции синего цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции синего цвета на уровне или чуть ниже зоны адсорбции арбутина и над ней зона адсорбции синего цвета; допускается обнаружение других зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

***Влажность*.** Не более 12,0 % (ОФС «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных средств растительного происхождения»).

***Зола общая*.** Не более 4,0 % (ОФС «Зола общая»).

***Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте*.** Не более 2,0 % (ОФС «Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте»).

***Измельчённость*.** Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение подлинности, измельчённости и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

*Цельное сырьё*: частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, – не более 2 %.

*Измельчённое сырьё:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 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 %.

***Допустимые примеси*.** Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение подлинности, измельчённости и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

*Сырьё, изменившее окраску (листья, потемневшие с обеих сторон)*.*Цельное сырьё* – не более 3 %.

*Другие части растения (веточки, плоды)*. *Цельное сырьё* – не более 4 %.

*Органическая примесь****.*** *Цельное сырьё, измельчённое сырьё* – не более 0,5 %.

*Минеральная примесь****.*** Не более 0,5 %.

**Тяжёлые металлы и мышьяк.** В соответствии с ОФС «Определение содержания тяжёлых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

**Радионуклиды.** В соответствии с ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

**Заражённость вредителями запасов**. В соответствии с ОФС «Определение степени заражённости лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов вредителями запасов».

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

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Определение проводят одним из приведённых методов.

***1. Сумма фенологликозидов в пересчёте на арбутин.*** Определение проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях»

*Раствор стандартного образца арбутина.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,1 г (точная навеска) фармакопейного стандартного образца арбутина, прибавляют 80 мл спирта 70 % и нагревают на водяной бане до полного растворения. Затем раствор охлаждают, доводят объём раствора тем же растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 7,0 мл полученного раствора, доводят объём раствора спиртом 70 % до метки.

*Исходный раствор.* Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. В коническую колбу со шлифом вместимостью 250 мл помещают 0,5 г (точная навеска) измельчённого сырья, прибавляют 100 мл спирта 70 % и взвешивают с погрешностью ±0,01 г. Колбу с содержимым присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане в течение 45 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Содержимое колбы охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и при необходимости доводят спиртом 70 % до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через беззольный фильтр, отбрасывая первые 10 мл фильтрата.

*Испытуемый раствор.* Пропускают через стеклянную хроматографическую 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 %, 3,0 мл исходного раствора. Далее раствор элюируют 15 мл спирта 70 % и элюат собирают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объём раствора спиртом 70 % до метки.

*Раствор сравнения.* Спирт 70 %, который предварительно пропускают через колонку с алюминия оксидом нейтральным для хроматографии.

Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 285 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора стандартного образца арбутина в аналогичных условиях относительно раствора сравнения.

Содержание суммы фенологликозидов в пересчёте на арбутин в сухом сырье в процентах (*Х*) вычисляют по формуле:

$$X= \frac{A ∙a\_{о}∙100 ∙ 25 ∙7∙100∙100∙ P}{А\_{о}∙a ∙100∙100∙100 ∙3∙(100-W)},$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где, | *A* | – | оптическая плотность испытуемого раствора; |
|  | *A*о | – | оптическая плотностьраствора стандартного образца арбутина; |
|  | *a* | – | навеска сырья, г; |
|  | *а*о | – | навеска фармакопейного стандартного образца арбутина, г; |
|  | *P* | – | содержание арбутина в фармакопейном стандартном образце арбутина, %; |
|  | *W* | – | влажность сырья, %. |

Допускается содержание суммы фенологликозидов в пересчёте на арбутин в сухом сырье вычислять с использованием удельного показателя поглощения по формуле:

$$X= \frac{A ∙100 ∙ 25 ∙100 }{72∙a ∙3 ∙(100-W)},$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где, | *A* | − | оптическая плотность испытуемого раствора; |
|  | *а* | − | навеска сырья, г; |
|  | *72* | − | удельный показатель поглощения арбутина при длине волны 285 нм ($А\_{1см}^{1\%}$); |
|  | *W* | − | влажность сырья, %. |

*2. Арбутин*. Определение проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

*Подвижная фаза (ПФ)*. Метанол—вода 10:90.

*Испытуемый раствор.* Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. В коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл помещают 0,8 г (точная навеска) измельчённого сырья, прибавляют 20 мл воды. Колбу с содержимым присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане в течение 30 мин. Затем охлаждают и фильтруют через вату в мерную колбу вместимостью 50 мл. Вату помещают в колбу с остатками сырья, прибавляют 20 мл воды и нагревают на водяной бане в течение 30 мин. После охлаждения извлечения фильтруют через вату в ту же мерную колбу и доводят объём раствора водой до метки. Содержимое мерной колбы фильтруют через беззольный фильтр, отбрасывая первые 10 мл фильтрата.

*Раствор стандартного образца арбутина*. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 0,05 г (точная навеска) фармакопейного стандартного образца арбутина, прибавляют 30 мл ПФ и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 2,5 мг гидрохинона, растворяют в 5 мл ПФ и доводят объём раствора тем же растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 5,0 мл полученного раствора, прибавляют 2,5 мл раствора стандартного образцаарбутина и доводят объём раствора ПФ до метки.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 250 × 4 мм, силикагель октадецилсилильный, деактивированный по отношению к основаниям, для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки | 25 °С; |
| Скорость потока | 1,2 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 280 нм; |
| Объём пробы | 20 мкл. |

Хроматографируют раствордля проверки разделительной способности хроматографической системы, раствор стандартного образца арбутина ииспытуемый раствор.

*Пригодность хроматографической системы*

На хроматограмме раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы:

- *разрешение* (*RS*) между пиками арбутина и гидрохинона должно быть не менее 4,0.

Содержание арбутина в пересчёте на сухое сырьё в процентах (*Х*) вычисляют по формуле:

$$X= \frac{S\_{1} ∙a\_{о}∙50∙ P∙100}{S\_{о}∙a ∙50∙(100-W)},$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | – | площадь пика арбутина на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*о | – | площадь пика арбутина на хроматограмме раствора стандартного образца арбутина; |
|  | *a* | – | навеска сырья, г; |
|  | *а*о | – | навеска фармакопейного стандартного образца арбутина, г; |
|  | *P* | – | содержание арбутина в фармакопейном стандартном образце арбутина, %; |
|  | *W* | – | влажность сырья, %. |

УПАКОВКА, МАРКИРОВКА И ПЕРЕВОЗКА

В соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и перевозка лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

ХРАНЕНИЕ

В соответствии с ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».