**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Леспедецы двухцветной побеги** |  | **ФС.2.5.0118** |
| **Lespedezae bicolоris cormi** |  | **Взамен ВФС 42-1942-89** |

|  |
| --- |
|  |

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Собранные в фазу цветения и высушенные побеги дикорастущего многолетнего кустарника леспедецы двухцветной – *Lespedeza bicolor* Turcz., сем. бобовых – *Fabaceae*.

Содержит не менее 0,25 % суммы флавоноидов в пересчёте на лютеолин-7-глюкозид в сухом сырье.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

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

*Цельное сырьё*. Верхушки побегов длиной до 30 см, цельные или частично измельчённые листья, бутоны, цветки и незрелые плоды. Стебли округлые, с неясными рёбрами, опушённые прижатыми белыми волосками или голые. Листья длинночерешковые, тройчатые, с мелкими шиловидными прилистниками. Листочки овальные, эллиптические или яйцевидные с коротким шипиком, иногда с выемкой на верхушке, цельнокрайние, длиной до 7 см, шириной до 5 см. Соцветие – метёлка из раскидистых негустых кистей. Цветки мотылькового типа, цветоносы опушённые. Чашечка короткоопушённая, длиной до 4 мм, с 4 долями. Венчик длиной около 10 мм. Плод – боб, длиной до 10 мм, плоский, односемянный, с сетью выступающих жилок.

Цвет стеблей желтовато-зелёный, листьев – сверху зелёный, снизу серовато-зелёный, венчик розовато-фиолетовый с тёмно-фиолетовым концом. Запах слабый, характерный.

*Измельчённое сырьё.* Смесь кусочков листьев, стеблей, соцветий, незрелых плодов различной формы, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм.

Цвет желтовато-зелёный, серовато-зелёный с розовато-фиолетовыми или тёмно-фиолетовыми вкраплениями. Запах слабый, характерный.

***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 эпидермиса с прямыми или слабоизвилистыми стенками, нижнего – с извилистыми стенками. Устьица овальные, окружены 4–5 (реже 2–3) клетками эпидермиса (аномоцитный, реже парацитный тип), преобладают на нижней стороне листа. Волоски немногочисленные, преимущественно по жилкам, в большем числе на нижней стороне. Преобладают простые двухклеточные волоски с гладкой поверхностью, состоящие из округлой базальной клетки и верхней длинной терминальной клетки с утолщёнными стенками и широкой полостью. Редко встречаются простые многоклеточные волоски с удлинёнными или укороченными клетками, иногда с зеленовато-коричневым содержимым, и головчатые с одноклеточной головкой на одно-трёхклеточной ножке. Клетки эпидермиса в местах прикрепления двухклеточных волосков расположены радиально и образуют розетку. Заметны валики – места прикрепления опавших волосков. Главная и крупные боковые жилки имеют кристаллоносную обкладку из призматических кристаллов оксалата кальция и тяжи механических волокон. Губчатая паренхима листа представлена аэренхимой. В губчатой паренхиме листа встречаются секреторные ходы с жёлто-коричневым содержимым.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1 | 2 | 3 |
| 4 | 5 | 6 |
|  | 7 |  |

Рисунок 1 – Леспедецы двухцветной побеги

1 – верхний эпидермис листа с простыми волосками (40×); 2 – нижний эпидермис листа с устьицами аномоцитного типа (200×); 3 – нижний эпидермис листа с простым волоском (200×); 4 – место прикрепления волоска (200×); 5 – кристаллоносная обкладка и кристаллический песок вдоль жилки листа (40×); 6 – призматические кристаллы оксалата кальция (200×); 7 – секреторные ходы (200×).

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

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

*Пластинка.* ТСХ пластинка со слоем силикагеля.

*Подвижная фаза (ПФ).* Этилацетат—уксусная кислота ледяная—вода 10:2:2.

*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 1,0 г измельчённого сырья, прибавляют 10 мл спирта 70 % и настаивают в течение 24 ч, после чего фильтруют через беззольный фильтр. Фильтрат упаривают на водяной бане до объёма около 1 мл.

*Раствор лютеолина-7-глюкозида.* В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 10 мг лютеолина-7-глюкозида, высушенного до постоянной массы, растворяют в спирте 70 % и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Реактив для детектирования.* Алюминия хлорида раствор 5 % в спирте 70 %.

На линию старта пластинки наносят 20 мкл испытуемого раствора и 10 мкл раствора лютеолина-7-глюкозида. Пластинку с нанесёнными пробами сушат на воздухе, помещают в предварительно насыщенную в течение не менее 1 ч камеру с 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. Хроматограмму опрыскивают реактивом для детектирования, нагревают при температуре 100–105 °С в течение 5 мин и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

*Результат*

На хроматограмме раствора лютеолина-7-глюкозида должна обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией жёлто-коричневого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться две зоны адсорбции с флуоресценцией жёлтого цвета, выше две зоны адсорбции с флуоресценцией желтовато-коричневого цвета, над ними зона адсорбции с флуоресценцией желтовато-коричневого цвета на уровне зоны адсорбции лютеолина-7-глюкозида; допускается обнаружение других зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

***Влажность.*** Неболее 11,0 % (ОФС «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных средств растительного происхождения»).

***Зола общая.***Не более 7,0 % (ОФС «Зола общая»).

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

*Измельчённое сырьё:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм − не более 20 %.

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

*Стебли толще 3 мм.* Цельное сырьё *–* не более 10 %.

*Органическая примесь.* Неболее 1,5 %.

*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 методом спектрофотометрии (ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях»).

*Приготовление хроматографической колонки.* В стеклянную колонку диаметром 2 см и высотой 50 см с пористым фильтром № 2 помещают ватный тампон, пропитанный водой, после чего помещают 3,0 г полиамида 6 порошка. Промывают колонку водой, оставляя слой воды высотой 3 см.

*Растворитель.* Вода—1,4-диоксан 1:1.

*Испытуемый раствор.* Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. В колбу вместимостью 500 мл помещают 3,0 г (точная навеска) измельчённого сырья, прибавляют 300 мл спирта 96 % и экстрагируют при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки в течение 3 ч. Полученное извлечение фильтруют через беззольный фильтр в колбу вместимостью 500 мл, отбрасывая первые 5 мл. В круглодонную колбу вместимостью 50 мл переносят 10 мл фильтрата, прибавляют 10 мл натрия хлорида раствора 5 %, упаривают до 1/4 первоначального объёма на водяной бане при температуре 80 °С под вакуумом и охлаждают. Охлаждённый остаток количественно переносят на колонку с полиамидным сорбентом, фильтруя его через воронку с небольшим ватным тампоном. Остаток упаренного извлечения смывают со стенок колбы 20 мл воды, предназначенной для промывания колонки. Колонку промывают 80 мл воды со скоростью элюирования не более 4 мл/мин. Водный элюат отбрасывают. По окончании промывки колонки водой уровень жидкости не должен превышать уровня ватного тампона. Затем колонку промывают с той же скоростью 100 мл спирта 70 %, отбрасывая первые 10 мл элюата, последующий элюат собирают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 1 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и доводят объём элюата спиртом 70 % до метки.

*Раствор стандартного образца лютеолина-7-глюкозида.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 0,04 г (точная навеска) фармакопейного стандартного образца лютеолина-7-глюкозида, растворяют в растворителе и доводят объём раствора тем же растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,0 мл раствора стандартного образца лютеолина-7-глюкозида, прибавляют 1 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и доводят объём раствора спиртом 70 % до метки.

*Раствор сравнения.* Промывают подготовленную колонку с полиамида 6 порошком 100 мл воды со скоростью не более 4 мл/мин, водный элюат отбрасывают. Колонку промывают 100 мл спирта 70 %, отбрасывая первые 10 мл, а последующий элюат собирают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 1 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и доводят объём раствора спиртом 70 % до метки.

Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора и раствора стандартного образца лютеолина-7-глюкозида на спектрофотометре при длине волны 354 нм в кювете с толщиной слоя 1 см относительно раствора сравнения.

Содержание суммы флавоноидов в пересчёте на лютеолин-7-глюкозид в сухом сырье в процентах (*Х*) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{A ∙ a\_{0} ∙ P ∙ 300 ∙ 100 ∙ 1 ∙100 ∙ 100}{A\_{0} ∙ a ∙ 50 ∙ 10 ∙ 100 ∙ 100 ∙ (100-W)},$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *A* | – | оптическая плотность испытуемого раствора; |
|  | *A*0 | – | оптическая плотность раствора стандартного образца лютеолина-7-глюкозида; |
|  | *а* | – | навеска сырья, г; |
|  | *а*0 | – | навеска фармакопейного стандартного образца лютеолина-7-глюкозида, г; |
|  | *P* | – | содержание лютеолин-7-глюкозида в фармакопейном стандартном образце лютеолин-7-глюкозида, %; |
|  | *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».