

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Донника трава

ФС.2.5.0011.15

Meliloti herba

Вводится впервые

Собранная в фазу цветения, высушенная трава дикорастущих и культивируемых двулетних травянистых растений донника лекарственного – *Melilotus officinalis* (L.) Desr. и донника рослого – *Melilotus altissimus* Thuil., сем. бобовых – *Fabaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Цельные или частично измельченные облиственные цветущие верхушки и боковые веточки с ребристым стеблем диаметром до 3 мм и длиной до 30 см. Прилистники ланцетные или шиловидные, почти всегда цельнокрайние, редко у самых нижних листочков с 1 – 2 зубчиками. Нижние листья обратнойцевидные, верхние – продолговатые или ланцетные, по краю с обеих сторон с 10 – 13 неровными зубчиками у донника лекарственного и с 8 – 20 зубчиками у донника рослого.

Цветки мотыльковые мелкие длиной от 5 до 7 мм. Чашечка колокольчатая пятизубчатая, остающаяся при плоде, голая у донника лекарственного и опушенная у донника рослого. Иногда встречаются в незначительном количестве мелкие незрелые плоды – бобы длиной от 3 до 5 мм, неясносетчатые или поперечно-морщинистые, голые или покрытые редкими волосками. Семя одно, реже два.

Цвет стеблей зеленый, желтовато-зеленый, зеленовато-желтый, на изломе – серовато- или желто-белый, листьев и плодов – зеленый, желтовато-

зеленый, зеленовато-желтый, цветков и бутонов – желтый. Запах ароматный (кумариновый). Вкус водного извлечения горьковатый или солоновато-горьковатый.

Измельченное сырье. При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки листьев, стеблей и соцветий различной формы, отдельные цветки, бутоны, плоды и их части, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 5 мм. Цвет стеблей снаружи зеленый, желтовато-зеленый, зеленовато-желтый, на изломе – серовато- или желтовато-белый, листьев и плодов – зеленый, желтовато-зеленый, зеленовато-желтый с коричневыми вкраплениями бобов, цветков и бутонов – желтый. Запах ароматный (кумариновый). Вкус водного извлечения горьковатый или солоновато-горьковатый.

Порошок. При рассмотрении порошка под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки листьев и стеблей различной формы, отдельные бутоны, части цветков и плодов, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Цвет серовато-зеленый, зеленовато-желтый с серовато- или желтовато-белыми, желтыми, темно-зелеными, коричневыми вкраплениями. Запах ароматный (кумариновый). Вкус водного извлечения горьковатый или солоновато-горьковатый.

Микроскопические признаки. Цельное сырье, измельченное сырье. При рассмотрении листа с поверхности видны изодиаметрические клетки верхнего эпидермиса со слабоизвилистыми стенками, нижнего – с более извилистыми стенками. Складчатая кутикула – на верхушках зубчиков. Устьица овальные, окружены 2 – 5 околоустьичными клетками (аномоцитный тип), расположены на верхнем и нижнем эпидермисе. Встречаются волоски 2 типов: простые одноклеточные, тонкостенные и толстостенные с заостренным концом и бородавчатой кутикулой; головчатые волоски с овальной многоклеточной головкой на короткой 1–2-клеточной ножке, вокруг места прикрепления волоска клетки эпидермиса образуют

розетку. Жилки листа окружены кристаллоносной обкладкой.

При рассмотрении лепестков с поверхности видны клетки эпидермиса с сосочковидными выростами. Клетки эпидермиса чашелистиков и цветоножек продольно вытянутые и имеют прямые или слабоизвилистые стенки, иногда со складчатой кутикулой. Устьица аномоцитного типа, расположенные с наружной стороны чашелистиков. На поверхности чашелистиков и цветоножек имеются многочисленные простые одноклеточные волоски и головчатые волоски и их фрагменты. Жилки чашелистиков окружены кристаллоносной обкладкой.

При рассмотрении давленого препарата стебля видны продольно вытянутые клетки эпидермиса с прямыми стенками, устьица аномоцитного типа, редкие, на поверхности встречаются волоски, характерные для данного сырья, но часто крупнее. Паренхима состоит из клеток овальной или вытянутой формы, встречаются механические волокна, кристаллы оксалата кальция, сосуды спирального типа.

Порошок. При рассмотрении микропрепаратов видны фрагменты эпидермиса с клетками со слабоизвилистыми и извилистыми стенками, устьицами овальными, окруженными 2 – 5 околоустьичными клетками (аномоцитный тип). У фрагментов эпидермиса лепестков наблюдаются сосочковидные выросты. На некоторых фрагментах листа и чашелистиков встречаются характерные волоски: простые одноклеточные, тонкостенные и толстостенные с заостренным концом и бородавчатой кутикулой, вокруг места прикрепления волоска клетки эпидермиса образуют розетку; головчатые волоски с овальной многоклеточной головкой на короткой 1–2-клеточной ножке и их фрагменты. Фрагменты мезофилла включают жилки с кристаллоносной обкладкой. Проводящие пучки представлены спиральными сосудами.

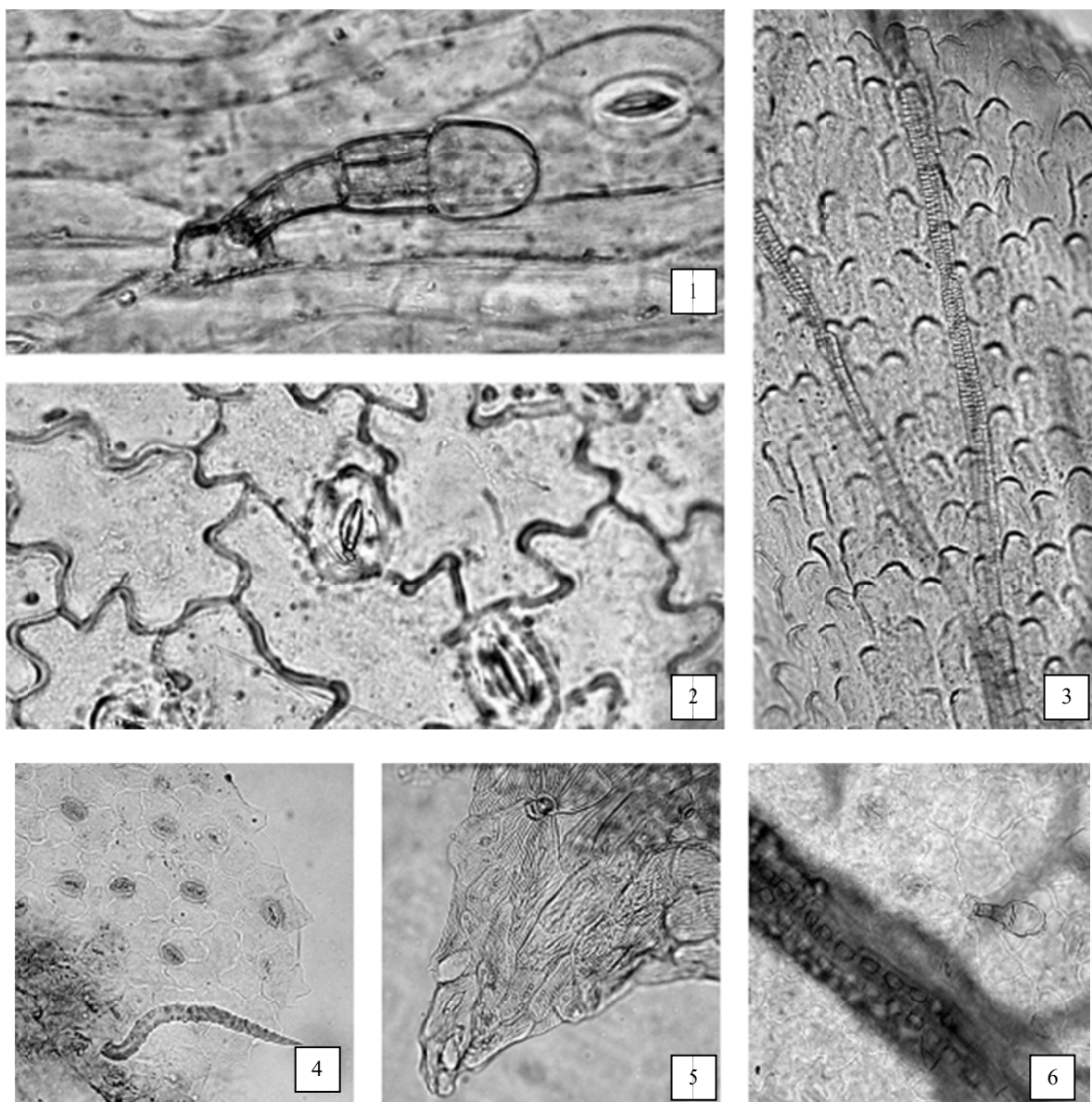


Рисунок – Донника трава.

1 – фрагмент эпидермиса стебля с головчатым волоском (400×); 2 – клетки нижнего эпидермиса листа с извилистыми стенками, устьица аномоцитного типа (400×); 3 – фрагмент лепестка (наружная сторона): клетки эпидермиса с сосочковидными выростами (400×); 4 – простой одноклеточный бородавчатый волосок (200×); 5 – фрагмент листа: клетки эпидермиса со складчатой кутикулой на зубчатом крае листа (200×); 6 – головчатый волосок, радиально расположенные клетки эпидермиса в месте прикрепления волоска, кристаллоносная обкладка вдоль жилки (200×).

Определение основных биологически активных веществ

1. Тонкослойная хроматография

Раствор для детектирования. Калия гидроксида 2 М раствор спиртовой.

Около 1,8 г измельченного сырья до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл спирта 96 % и нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 30 мин. После охлаждения полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта высокоэффективной хроматографической пластинки со слоем силикагеля на алюминиевой подложке размером 10×10 см наносят 20 мкл испытуемого раствора и 20 мкл раствора стандартного образца (СО) кумарина (см. раздел «Количественное определение» раствор А СО кумарина). Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре, помещают в камеру предварительно насыщенную в течение не менее 30 мин смесью растворителей уксусная кислота разведенная 12 % – эфир – толуол (10:50:50), 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, обрабатывают раствором для детектирования и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО кумарина должна обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией зеленого, голубовато-зеленого или желтовато-зеленого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться зоны адсорбции с флуоресценцией: зеленого, голубовато-зеленого или желтовато-зеленого цвета на уровне зоны на хроматограмме раствора СО кумарина, зона сине-голубого цвета ниже зоны кумарина; возможно обнаружение зоны адсорбции с флуоресценцией зеленого, голубовато-зеленого или желтовато-зеленого цвета ниже зоны кумарина; допускается обнаружение других зон адсорбции.

2. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого

раствора, полученного для количественного определения, должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме раствора СО кумарина (см. раздел «Количественное определение»).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 14 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 10 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 2 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 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 %.

Посторонние примеси

Стебли диаметром свыше 3 мм. *Цельное сырье* – не более 2 %.

Сырье, изменившее окраску (потемневшее и почерневшее). *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 2 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 0,5 %.

Тяжелые металлы. 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».

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. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок:* кумарина – не менее 0,3 %.

Приготовление растворов.

Раствор СО кумарина. Около 0,025 г (точная навеска) СО кумарина растворяют в спирте 96 % в мерной колбе вместимостью 50 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор А СО кумарина). Срок годности раствора не более 30 сут при хранении в хорошо укупоренной упаковке, в прохладном защищенном от света месте.

1,0 мл раствора А СО кумарина переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б СО кумарина). Раствор Б используют свежеприготовленным.

Проверка пригодность хроматографической системы.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- фактор асимметрии пика (Т) кумарина не менее 0,8 и не более 1,5;
- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику кумарина, – не менее 1500 теоретических тарелок;
- относительное стандартное отклонение площади пика кумарина – не более 3 %.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм. Около 1,8 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл спирта 96 %, нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 30 мин. После охлаждения надосадочную жидкость фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. Извлечение повторяют дважды,

используя 30 и 25 мл спирта 96 % соответственно, при этом при последнем извлечении бумажный фильтр переносят в колбу для экстракции. Объем извлечения в мерной колбе доводят до метки спиртом 96 %, одновременно промывая колбу, в которой проводили экстракцию, и перемешивают. Полученное извлечение фильтруют через фильтр с размером пор 0,45 мкм, отбрасывая первые 1 – 2 мл фильтрата (раствор А испытуемого раствора).

Условия хроматографирования

Колонка	125 × 4,0 мм, эндкепированный октадецилсилил (C ₁₈) силикагель для хроматографии, 5 мкм.
Предколонка	4 × 4 мм, эндкепированный октадецилсилил (C ₁₈) силикагель для хроматографии, 5 мкм.
Подвижная фаза	<p>Ацетонитрила раствор 25 % в фосфорной кислоты растворе 0,3 %.</p> <p>Фосфорной кислоты раствор 0,3 %. 3,0 мл фосфорной кислоты концентрированной помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, доводят объем раствора водой для хроматографии до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют и дегазируют.</p> <p>Срок годности раствора 30 сут при хранении в хорошо укупленной упаковке, в прохладном защищенном от света месте.</p> <p>Ацетонитрила раствор 25 % в фосфорной кислоты растворе 0,3 %. 250 мл ацетонитрила для хроматографии помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, доводят до метки фосфорной кислоты раствором 0,3 % и перемешивают. Полученный раствор фильтруют и дегазируют.</p> <p>Срок годности раствора 7 сут при хранении в</p>

хорошо укупоренной упаковке, в прохладном защищенном от света месте.

Скорость потока, мл/мин	1
Температура колонок, °С	комнатная (20 ± 2)
Детектор	диодная матрица или спектрофотометрический; длина волны 275 нм
Объем вводимой пробы, мкл	10
Время хроматографирова ния, мин	12

Хроматографируют попеременно испытуемый раствор и раствор СО кумарина, получая не менее 3 хроматограмм. Результаты считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы». Расчет содержания кумарина, проводят методом внешнего стандарта.

Содержание кумарина в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 100}{S_0 \cdot 50 \cdot 10 \cdot a} \cdot \frac{100 \cdot 100}{100 - W} \cdot \frac{P}{100} = \frac{S \cdot a_0 \cdot 20 \cdot P}{S_0 \cdot a \cdot (100 - W)}$$

где S – площадь пика кумарина на хроматограмме раствора А испытуемого раствора;

a_0 – навеска СО кумарина, г;

S_0 – площадь пика кумарина на хроматограмме раствора Б СО кумарина;

a – навеска сырья, г;

P – содержание основного вещества в СО кумарина, %;

W – влажность сырья, %.

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».