МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСУДАРСТВЕННАЯ
ФАРМАКОПЕЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

XIII издание

Том III

Москва
2015

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Содержание

2. Фармакопейные статьи

2.1. Фармацевтические субстанции синтетического происхождения

2.1.1. Аминокапроновая кислота *(ФС.2.1.0001.15)*

2.1.2. Амлодипина бесилат *(ФС.2.1.0002.15)*

2.1.3. Метамизол натрия *(ФС.2.1.0003.15)*

2.1.4. Умифеновира гидрохлорид *(ФС.2.1.0004.15)*

2.1.5. Артикаина гидрохлорид *(ФС.2.1.0005.15)*

2.1.6. Ацетилсалициловая кислота *(ФС.2.1.0006.15)*

2.1.7. Бензилникотинат *(ФС.2.1.0007.15)*

2.1.8. Бриллиантовый зеленый *(ФС.2.1.0008.15)*

2.1.9. Бромгексина гидрохлорид *(ФС.2.1.0009.15)*

2.1.10. Бутилпарагидроксибензоат *(ФС.2.1.0010.15)*

2.1.11. Валидол *(ФС.2.1.0011.15)*

2.1.12. Гликлазид *(ФС.2.1.0012.15)*

2.1.13. Висмута субгаллат *(ФС.2.1.0013.15)*

2.1.14. Мебгидролина нападизилат *(ФС.2.1.0014.15)*

2.1.15. Диоксидин *(ФС.2.1.0015.15)*

2.1.16. Дроперидол *(ФС.2.1.0016.15)*

2.1.17. Индапамид *(ФС.2.1.0017.15)*

2.1.18. Калия перманганат *(ФС.2.1.0018.15)*

2.1.19. Кальция глюконат *(ФС.2.1.0019.15)*

2.1.20. Карбамазепин *(ФС.2.1.0020.15)*

2.1.21. Кетамина гидрохлорид *(ФС.2.1.0021.15)*

2.1.22. Кеторолак трометамол *(ФС.2.1.0022.15)*

2.1.23. Левоментол *(ФС.2.1.0023.15)*

2.1.24. Лимонная кислота *(ФС.2.1.0024.15)*

2.1.25. Мелоксикам *(ФС.2.1.0025.15)*

2.1.26. Рацементол *(ФС.2.1.0026.15)*

Российская электронная медицинская библиотека

2.1.27. Натриевая соль *N*-никотиноил гамма-аминомасляной кислоты *(ФС.2.1.0027.15)*

2.1.28. Натрия пропилпарагидроксибензоат *(ФС.2.1.0028.15)*

2.1.29. Нифедипин *(ФС.2.1.0029.15)*

2.1.30. Пиразинамид *(ФС.2.1.0030.15)*

2.1.31. Рибавирин *(ФС.2.1.0031.15)*

2.1.32. Рифампицин *(ФС.2.1.0032.15)*

2.1.33. Салициловая кислота *(ФС.2.1.0033.15)*

2.1.34. Сахароза *(ФС.2.1.0034.15)*

2.1.35. Сорбиновая кислота *(ФС.2.1.0035.15)*

2.1.36. Спирт этиловый 95%, 96% *(ФС.2.1.0036.15)*

2.1.37. Стрептомицина сульфат *(ФС.2.1.0037.15)*

2.1.38. Сульфаниламид *(ФС.2.1.0038.15)*

2.1.39. Таурин *(ФС.2.1.0039.15)*

2.1.40. Тимол *(ФС.2.1.0040.15)*

2.1.41. Фенобарбитал *(ФС.2.1.0041.15)*

2.1.42. Фенол *(ФС.2.1.0042.15)*

2.1.43. Формальдегида раствор *(ФС.2.1.0043.15)*

2.1.44. Фуксин основной *(ФС.2.1.0044.15)*

2.1.45. Эналаприла малеат *(ФС.2.1.0045.15)*

2.1.46. Этилметилгидроксипиридина сукцинат *(ФС.2.1.0046.15)*

2.1.47. Этиловый эфир альфа-бромизовалериановой кислоты *(ФС.2.1.0047.15)*

2.1.48. Этилпарагидроксибензоат *(ФС.2.1.0048.15)*

2.2. Фармацевтические субстанции минерального происхождения

2.2.1. Бария сульфат *(ФС.2.2.0001.15)*

2.2.2. Борная кислота *(ФС.2.2.0002.15)*

2.2.3. Вазелин *(ФС.2.2.0003.15)*

2.2.4. Масло вазелиновое *(ФС.2.2.0004.15)*

2.2.5. Водорода пероксид *(ФС.2.2.0005.15)*

Федеральная электронная медицинская библиотека

2.2.6. Глицерин *(ФС.2.2.0006.15)*

2.2.7. Йод *(ФС.2.2.0007.15)*

2.2.8. Калия йодид *(ФС.2.2.0008.15)*

2.2.9. Калия хлорид *(ФС.2.2.0009.15)*

2.2.10. Магния сульфат *(ФС.2.2.0010.15)*

2.2.11. Натрия гидрокарбонат *(ФС.2.2.0011.15)*

2.2.12. Натрия тетраборат *(ФС.2.2.0012.15)*

2.2.13. Натрия фторид *(ФС.2.2.0013.15)*

2.2.14. Натрия хлорид *(ФС.2.2.0014.15)*

2.2.15. Парафин твердый *(ФС.2.2.0015.15)*

2.2.16. Сера осажденная *(ФС.2.2.0016.15)*

2.2.17. Тальк *(ФС.2.2.0017.15)*

2.2.18. Цинка оксид *(ФС.2.2.0018.15)*

2.2.19. Вода для инъекций *(ФС.2.2.0019.15)*

2.2.20. Вода очищенная *(ФС.2.2.0020.15)*

2.5. Лекарственное растительное сырье, фармацевтические субстанции растительного происхождения

2.5.1. Алтея корни *(ФС.2.5.0001.15)*

2.5.2. Аронии черноплодной свежие плоды *(ФС.2.5.0002.15)*

2.5.3. Аронии черноплодной сухие плоды *(ФС.2.5.0003.15)*

2.5.4. Бадана толстолистного корневища *(ФС.2.5.0004.15)*

2.5.5. Березы листья *(ФС.2.5.0005.15)*

2.5.6. Березы почки *(ФС.2.5.0006.15)*

2.5.7. Бессмертника песчаного цветки *(ФС.2.5.0007.15)*

2.5.8. Бузины черной цветки *(ФС.2.5.0008.15)*

2.5.9. Валерианы лекарственной корневища с корнями *(ФС.2.5.0009.15)*

2.5.10. Гинкго двулопастного листья *(ФС.2.5.0010.15)*

2.5.11. Донника трава *(ФС.2.5.0011.15)*

2.5.12. Душицы обыкновенной трава *(ФС.2.5.0012.15)*

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

2.5.13. Женьшеня настоящего корни *(ФС.2.5.0013.15)*

2.5.14. Жостера слабительного плоды *(ФС.2.5.0014.15)*

2.5.15. Зверобоя трава *(ФС.2.5.0015.15)*

2.5.16. Земляники лесной листья *(ФС.2.5.0016.15)*

2.5.17. Калины обыкновенной кора *(ФС.2.5.0017.15)*

2.5.18. Кориандра посевного плоды *(ФС.2.5.0018.15)*

2.5.19. Крапивы двудомной листья *(ФС.2.5.0019.15)*

2.5.20. Красавки трава *(ФС.2.5.0020.15)*

2.5.21. Крушины ольховидной кора *(ФС.2.5.0021.15)*

2.5.22. Ландыша трава, ландыша листья, ландыша цветки *(ФС.2.5.0022.15)*

2.5.23. Лапчатки прямостоячей корневища *(ФС.2.5.0023.15)*

2.5.24. Липы цветки *(ФС.2.5.0024.15)*

2.5.25. Лопуха корни *(ФС.2.5.0025.15)*

2.5.26. Льна посевного семена *(ФС.2.5.0026.15)*

2.5.27. Мать-и-мачехи обыкновенной листья *(ФС.2.5.0027.15)*

2.5.28. Можжевельника обыкновенного плоды *(ФС.2.5.0028.15)*

2.5.29. Мяты перечной листья *(ФС.2.5.0029.15)*

2.5.30. Ноготков лекарственных цветки *(ФС.2.5.0030.15)*

2.5.31. Пижмы обыкновенной цветки *(ФС.2.5.0031.15)*

2.5.32. Подорожника большого листья *(ФС.2.5.0032.15)*

2.5.33. Полыни горькой трава *(ФС.2.5.0033.15)*

2.5.34. Пустырника трава *(ФС.2.5.0034.15)*

2.5.35. Расторопши пятнистой плоды *(ФС.2.5.0035.15)*

2.5.36. Родиолы розовой корневища и корни *(ФС.2.5.0036.15)*

2.5.37. Ромашки аптечной цветки *(ФС.2.5.0037.15)*

2.5.38. Сенны листья *(ФС.2.5.0038.15)*

2.5.39. Синюхи голубой корневища с корнями *(ФС.2.5.0039.15)*

2.5.40. Солодки корни *(ФС.2.5.0040.15)*

2.5.41. Сосны обыкновенной почки *(ФС.2.5.0041.15)*

2.5.42. Тополя почки *(ФС.2.5.0042.15)*

Государственная медицинская библиотека Электронная

2.5.43. Укропа пахучего плоды *(ФС.2.5.0043.15)*

2.5.44. Фиалки трава *(ФС.2.5.0044.15)*

2.5.45. Хвоща полевого трава *(ФС.2.5.0045.15)*

2.5.46. Хмеля обыкновенного соплодия *(ФС.2.5.0046.15)*

2.5.47. Чабреца трава *(ФС.2.5.0047.15)*

2.5.48. Череды трехраздельной трава *(ФС.2.5.0048.15)*

2.5.49. Черемухи обыкновенной плоды *(ФС.2.5.0049.15)*

2.5.50. Черники обыкновенной плоды *(ФС.2.5.0050.15)*

2.5.51. Шалфея лекарственного листья *(ФС.2.5.0051.15)*

2.5.52. Щавеля конского корни *(ФС.2.5.0052.15)*

2.5.53. Элеутерококка колючего корневища и корни *(ФС.2.5.0053.15)*

2.5.54. Эрвы шерстистой трава *(ФС.2.5.0054.15)*

2.5.55. Эхинацеи пурпурной трава *(ФС.2.5.0055.15)*

3. Лекарственные препараты

3.3. Биологические лекарственные препараты

3.3.1. Иммунобиологические лекарственные препараты

3.3.1.1. Аллерген туберкулезный рекомбинантный в стандартном разведении *(ФС.3.3.1.0001.15)*

3.3.1.2. Анатоксин дифтерийно-столбнячный адсорбированный (АДС - анатоксин) *(ФС.3.3.1.0002.15)*

3.3.1.3. Анатоксин дифтерийно-столбнячный адсорбированный с уменьшенным содержанием антигенов (АДС-М-анатоксин) *(ФС.3.3.1.0003.15)*

3.3.1.4. Анатоксин дифтерийный адсорбированный с уменьшенным содержанием антигена (АД-М-анатоксин) *(ФС.3.3.1.0004.15)*

3.3.1.5. Анатоксин стафилококковый очищенный адсорбированный, суспензия для подкожного введения *(ФС.3.3.1.0005.15)*

3.3.1.6. Анатоксин стафилококковый очищенный, раствор для подкожного введения *(ФС.3.3.1.0006.15)*

Федеральный электронный медицинский библиотека ФЭМБ

3.3.1.7. Анатоксин столбнячный адсорбированный (АС-анатоксин) *(ФС.3.3.1.0007.15)*

3.3.1.8. Трианатоксин адсорбированный *(ФС.3.3.1.0008.15)*

3.3.1.9. Тетраанатоксин адсорбированный *(ФС.3.3.1.0009.15)*

3.3.1.10. Вакцина коклюшно-дифтерийно-столбнячная адсорбированная (АКДС-вакцина) *(ФС.3.3.1.0010.15)*

3.3.1.11. Вакцина бруцеллезная живая *(ФС.3.3.1.0011.15)*

3.3.1.12. Вакцина брюшнотифозная Ви – полисахаридная *(ФС.3.3.1.0012.15)*

3.3.1.13. Вакцина дизентерийная против шигелл Зонне полисахаридная *(ФС.3.3.1.0013.15)*

3.3.1.14. Вакцина лептоспирозная концентрированная инактивированная жидкая *(ФС.3.3.1.0014.15)*

3.3.1.15. Вакцина менингококковая серогруппы А полисахаридная сухая *(ФС.3.3.1.0015.15)*

3.3.1.16. Вакцина сибиреязвенная живая *(ФС.3.3.1.0016.15)*

3.3.1.17. Вакцина сибиреязвенная комбинированная *(ФС.3.3.1.0017.15)*

3.3.1.18. Вакцина туберкулезная БЦЖ живая *(ФС.3.3.1.0018.15)*

3.3.1.19. Вакцина туляремийная живая *(ФС.3.3.1.0019.15)*

3.3.1.20. Вакцина холерная бивалентная химическая, таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой *(ФС.3.3.1.0020.15)*

3.3.1.21. Вакцина чумная живая, таблетки для рассасывания *(ФС.3.3.1.0021.15)*

3.3.1.22. Вакцина чумная живая *(ФС.3.3.1.0022.15)*

3.3.1.23. Туберкулин очищенный (ППД) (аллерген туберкулезный очищенный) *(ФС.3.3.1.0023.15)*

3.3.1.24. Вакцина против краснухи культуральная живая *(ФС.3.3.1.0024.15)*

3.3.1.25. Вакцина антирабическая культуральная концентрированная очищенная инактивированная *(ФС.3.3.1.0025.15)*

3.3.1.26. Вакцина гепатита В рекомбинантная *(ФС.3.3.1.0026.15)*

3.3.1.27. Вакцина гриппозная живая *(ФС.3.3.1.0027.15)*

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

3.3.1.28. Вакцина гриппозная инактивированная *(ФС.3.3.1.0028.15)*

3.3.1.29. Вакцина для профилактики гепатита А культуральная очищенная концентрированная адсорбированная инактивированная жидкая *(ФС.3.3.1.0029.15)*

3.3.1.30. Вакцина жёлтой лихорадки живая сухая, лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения *(ФС.3.3.1.0030.15)*

3.3.1.31. Вакцина клещевого энцефалита культуральная очищенная концентрированная инактивированная жидкая сорбированная или сухая в комплекте с растворителем алюминия гидроксида *(ФС.3.3.1.0031.15)*

3.3.1.32. Вакцина коревая культуральная живая *(ФС.3.3.1.0032.15)*

3.3.1.33. Вакцина оспенная живая *(ФС.3.3.1.0033.15)*

3.3.1.34. Вакцина оспенная инактивированная *(ФС.3.3.1.0034.15)*

3.3.1.35. Вакцина оспенная эмбриональная живая *(ФС.3.3.1.0035.15)*

3.3.1.36. Вакцина паротитная культуральная живая *(ФС.3.3.1.0036.15)*

3.3.1.37. Вакцина полиомиелитная пероральная 1, 2, 3 типов, раствор для приема внутрь *(ФС.3.3.1.0037.15)*

3.3.1.38. Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади *(ФС.3.3.1.0038.15)*

3.3.1.39. Иммуноглобулин человека противооспенный *(ФС.3.3.1.0039.15)*

3.3.1.40. Интерферон человеческий лейкоцитарный *(ФС.3.3.1.0040.15)*

3.3.1.41. Сыворотка противогангренозная поливалентная лошадиная *(ФС.3.3.1.0041.15)*

3.3.1.42. Сыворотки противоботулинические типов А, В, Е лошадиные *(ФС.3.3.1.0042.15)*

3.3.1.43. Сыворотка противодифтерийная лошадиная *(ФС.3.3.1.0043.15)*

3.3.1.44. Сыворотка противостолбнячная лошадиная *(ФС.3.3.1.0044.15)*

3.3.1.45. Сыворотка против яда змеи гадюки обыкновенной лошадиная *(ФС.3.3.1.0045.15)*

3.3.1.46. Сыворотка лошадиная разведенная 1: 100 *(ФС.3.3.1.0046.15)*

3.3.1.47. Пирогенал, раствор для внутримышечного введения *(ФС.3.3.1.0047.15)*

3.3.1.48. Пирогенал, суппозитории ректальные *(ФС.3.3.1.0048.15)*

3.3.2. Лекарственные препараты, полученные из крови и плазмы крови человека

3.3.2.1. Плазма человека для фракционирования *(ФС.3.3.2.0001.15)*

3.3.2.2. Фактор свертывания крови VII человека *(ФС.3.3.2.0002.15)*

3.3.2.3. Фактор свертывания крови VIII человека *(ФС.3.3.2.0003.15)*

3.3.2.4. Фактор свертывания крови IX человека *(ФС.3.3.2.0004.15)*

3.3.2.5. Фактор Виллебранда *(ФС.3.3.2.0005.15)*

3.3.2.6. Альбумин человека *(ФС.3.3.2.0006.15)*

3.3.2.7. Иммуноглобулин человека нормальный *(ФС.3.3.2.0007.15)*

3.3.2.8. Иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения *(ФС.3.3.2.0008.15)*

Приложения

Наименования, символы и относительные атомные массы элементов

Таблица. Количество капель в 1 г и в 1 мл и масса 1 капли жидких лекарственных препаратов при температуре 20 °С по стандартному каплемеру

Таблица. Изотонические эквиваленты лекарственных веществ по натрия хлориду

Алкоголеметрические таблицы

Таблица 1. Соотношение между плотностью водно-спиртового раствора и содержанием безводного спирта в растворе

Таблица 2. Массовые количества (в граммах при температуре 20 °С) воды и спирта различной крепости, которые необходимо смешать, чтобы получить 1 кг спирта крепостью от 30 до 92%

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Таблица 3. Объёмные количества воды, добавляемые к 1 л спирта известной концентрации для получения заданной крепости спирта от 30 до 90% (о/о)

Таблица 4. Объёмные количества спирта крепостью от 35 до 95% (в мл при температуре 20 °С), которые необходимо смешать для получения 1 л спирта крепостью от 30 до 90 %

Таблица 5. Объёмные количества спирта крепостью от 95,1 до 96,5% (в мл при температуре 20 °С) и воды, которые необходимо смешать для получения 1 л спирта крепостью от 30 до 90 объёмных процентов

ИК-спектры стандартных образцов фармацевтических субстанций

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Аминокапроновая кислота	**ФС.2.1.0001.15**
Аминокапроновая кислота	
Acidum aminocaproicum	**Взамен ВФС 42-2720-96**

6-Аминогексановая кислота



$C_6H_{13}NO_2$ М. м. 131,17

Содержит не менее 98,5 % и не более 101,0 % аминокапроновой кислоты $C_6H_{13}NO_2$ в пересчете на сухое вещество.

Описание. Белый или почти белый кристаллический порошок или бесцветные кристаллы без запаха.

Растворимость. Легко растворим в воде, мало или очень мало растворим в этаноле 96 %, практически нерастворим в хлороформе.

Подлинность

1. ИК-спектр. Инфракрасный (ИК) спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области частот от 4000 до 400 $см^{-1}$ по положению полос поглощения должен соответствовать рисунку ИК-спектра аминокапроновой кислоты (приложение).

2. Качественная реакция. 0,05 г субстанции растворяют в 2 мл воды, нейтрализуют 1 М раствором натрия гидроксида (индикатор – 0,05 мл 1 % раствора фенолфталеина), прибавляют 0,3 мл 0,1 % раствора нингидрина и нагревают до кипения; должно появиться синее окрашивание.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

3. Качественная реакция. 0,05 г субстанции растворяют в 2 мл воды, прибавляют 0,05 мл 1 % раствора фенолфталеина и 0,4 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида; должно появиться красное окрашивание. После прибавления 0,1 мл формалина, нейтрализованного по фенолфталеину (слабо-розовое окрашивание), окраска исчезает.

Температура плавления. От 202 до 206 °С (с разложением, ОФС «Температура плавления»).

***Прозрачность раствора**. Раствор 4 г субстанции в 20 мл воды должен быть прозрачным в течение 24 ч (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

***Цветность раствора**. Раствор, полученный в испытании на «Прозрачность раствора», должен быть бесцветным (ОФС «Степень окраски жидкостей»).

pH. От 7,5 до 8,0 (20 % раствор, ОФС «Ионометрия», метод 3).

Термическая устойчивость. Оптическая плотность 20 % раствора в воде при 287 нм не должна превышать 0,10, при 450 нм – 0,03. Оптическая плотность 20 % раствора, выдержанного при 98 - 102 °С в течение 72 ч, при 287 нм не должна превышать 0,15, при 450 нм – 0,03.

Родственные примеси. Определение проводят методом ТСХ.

Капролактам

Камера, насыщенная хлором. На дно камеры помещают стакан вместимостью 50 мл с 15 мл насыщенного раствора калия перманганата и быстро прибавляют 15 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 %. Камеру плотно закрывают крышкой.

Камеру готовят непосредственно перед использованием.

Испытуемый раствор. 0,10 г субстанции растворяют в 10 мл спирта 70 %.

Раствор сравнения А. 0,05 г капролактама растворяют в 20 мл спирта 70 %. 5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу объёмом 100 мл

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

и доводят спиртом 70 % до метки. Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор сравнения Б. 10 мл раствора сравнения А разбавляют спиртом 70 % до 25 мл. Раствор используют свежеприготовленным.

Проведение испытания. На линию старта пластинки со слоем силикагеля 60 F наносят 25 мкл испытуемого раствора (250 мкг), по 10 мкл раствора сравнения А (1,25 мкг) и раствора сравнения Б (0,5 мкг) и в одну точку – 25 мкл испытуемого раствора и 10 мкл раствора сравнения А (смесь для проверки пригодности хроматографической системы). Пластинку с нанесенными пробами высушивают на воздухе в течение 5 мин, помещают в камеру со смесью растворителей бутанол – вода - уксусная кислота ледяная (77:27:12) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт подвижной фазы пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры и высушивают на воздухе в течение 30 мин, а затем в сушильном шкафу при температуре 85 – 90 °С в течение 10 мин и помещают в камеру, насыщенную хлором. Через 10 мин пластинку вынимают, выдерживают в вытяжном шкафу в течение 30 мин и опрыскивают 1 % раствором калия иодида.

На хроматограмме испытуемого раствора допускается наличие одного дополнительного пятна на уровне пятна раствора сравнения А, не превышающее его по интенсивности окраски и величине (не более 0,5 % капролактама).

Хроматографическая система считается пригодной, если на хроматограмме раствора сравнения Б четко видно пятно, а на хроматограмме смеси для проверки пригодности хроматографической системы наблюдается 2 раздельных пятна.

Аминокислоты

Испытуемый раствор. 0,25 г субстанции растворяют в 5 мл воды.

Раствор сравнения. 0,5 мл испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

На линию старта пластинки со слоем силикагеля 60 F наносят по 10 мкл испытуемого раствора (500 мкг) и раствора сравнения (2,5 мкг). Пластинку с нанесенными пробами сушат в токе воздуха в течение 10 мин, помещают в камеру со смесью растворителей бутанол – вода – уксусная кислота ледяная (77:27:12) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт подвижной фазы пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры и сушат в сушильном шкафу при температуре 90 – 100 °С в течение 5 – 10 мин до исчезновения запаха растворителей, после чего опрыскивают 0,25 % раствором нингидрина. Пластинку снова выдерживают в сушильном шкафу при температуре 90 – 100 °С в течение 10 – 15 мин. Любое другое пятно на хроматограмме испытуемого раствора по интенсивности окраски и величине не должно превышать пятно на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,5 % посторонней аминокислоты).

Суммарное содержание посторонних аминокислот не должно превышать 1,0 %.

Хроматографическая система считается пригодной, если на хроматограмме раствора сравнения наблюдается четкое пятно.

Сульфатная зола. Не более 0,1 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют около 0,5 г (точная навеска) субстанции.

Тяжелые металлы. Не более 0,002 %. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Тяжёлые металлы» » в зольном остатке, полученном после сжигания 0,5 г субстанции (ОФС «Сульфатная зола»).

Потеря в массе при высушивании. Не более 0,5 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Для определения используют около 0,5 г (точная навеска) субстанции.

***Бактериальные эндотоксины**. Не более 0,05 ЕЭ на 1 мг аминокапроновой кислоты (ОФС «Бактериальные эндотоксины»). Для проведения испытания готовят исходный раствор субстанции 50 мг/мл, а затем разбавляют его не менее чем в 60 раз.

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

Количественное определение. Около 0,1 г (точная навеска) субстанции растворяют при нагревании до 35 – 40 °С в 15 мл уксусной кислоты ледяной и титруют 0,1 М раствором хлорной кислоты до перехода фиолетовой окраски в сине-зеленую (индикатор – 0,1 мл 0,1 % раствора кристаллического фиолетового).

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,1 М раствора хлорной кислоты соответствует 13,12 мг аминокапроновой кислоты $C_6H_{13}NO_2$.

Хранение. В плотно укупоренной упаковке.

*Контроль по показателям качества «Прозрачность раствора», «Цветность раствора» и «Бактериальные эндотоксины» проводят в субстанции, предназначенной для производства лекарственных препаратов для парентерального применения.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Амлодипина бесилат **ФС.2.1.0002.15**

Амлодипина бесилат

Amlodipini besilas **Взамен ГФ XII, ч.1, ФС 42-0214-07**

5-Метил-3-этил{(4*RS*)-2-[(2-аминоэтокси)метил]-6-метил-4-(2-хлорфенил)-1,4-дигидропиридин-3,5-дикарбоксилата} бензолсульфонат



$C_{20}H_{25}ClN_2O_5 \cdot C_6H_6O_3S$ М. м. 567,1

Содержит не менее 97,0 % и не более 102,0 % амлодипина бесилата $C_{20}H_{25}ClN_2O_5 \cdot C_6H_6O_3S$ в пересчете на сухое и свободное от остаточных органических растворителей вещество.

Описание. Белый или почти белый порошок.

Растворимость. Легко растворим в метаноле, умеренно растворим в спирте 96 %, мало растворим в воде.

Подлинность. *1. ИК-спектр.* Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области частот от 4000 до 400 $см^{-1}$ по положению полос поглощения должен соответствовать спектру стандартного образца амлодипина бесилата.

ФГБУ «Федеральная электронная медицинская библиотека»

2. *УФ-спектр.* Ультрафиолетовый спектр 0,005 % раствора субстанции в смеси метанол – 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты (99:1) в области длин волн от 300 до 400 нм должен иметь максимум поглощения при 360 нм.

Угол вращения. От – 0,10 до + 0,10° (1 % раствор субстанции в метаноле, ОФС «Поляриметрия»).

Родственные примеси. Определение проводят методом ВЭЖХ.

Буферный раствор pH 3,0. 7 мл триэтиламина растворяют в 1000 мл воды и доводят pH раствора до 3,0 ± 0,1 с помощью ортофосфорной кислоты.

Испытуемый раствор. 0,01 г субстанции растворяют в 10 мл подвижной фазы (ПФ).

Раствор сравнения. 3,0 мл испытуемого раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора ПФ до метки и перемешивают. 1,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора ПФ до метки и перемешивают.

Раствор для проверки пригодности хроматографической системы. 0,005 г субстанции растворяют в 5 мл водорода пероксида и выдерживают при температуре 70 °С в течение 45 мин.

Хроматографические условия

Колонка	15 × 0,39 см с октадецилсилилсиликагелем (С18), 5 мкм;
ПФ	ацетонитрил – метанол – буферный раствор с pH 3,0 (15:35:50);
Скорость потока	1,0 мл/мин;
Детектор	спектрофотометрический, 237 нм;
Объем пробы	10 мкл.

Хроматографируют раствор для проверки пригодности хроматографической системы. Относительные времена удерживания компонентов: примесь D амлодипина (5-метил-3-этил{2-[(2-аминоэтокси)метил]-6-метил-4-(2-хлорфенил)пиридин-3,5-дикарбоксилат}) – около 0,5; амлодипин – 1,0 (около 7 мин). Хроматографическая система

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

считается пригодной если разрешение (*R*) между пиками составляет не менее 4,5.

Хроматографируют раствор сравнения и испытуемый раствор. Время регистрации хроматограммы испытуемого раствора должно не менее чем в 3 раза превышать время удерживания основного пика.

Удвоенная площадь пика примеси D на хроматограмме испытуемого раствора должна быть не более площади пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,3 %); сумма площадей пиков всех других примесей должна быть не более площади пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,3 %). Не учитывают пик бензолсульфоновой кислоты (относительное время удерживания около 0,2) и пики, площадь которых составляет менее 0,1 площади пика на хроматограмме раствора сравнения (0,03 %).

Вода. Не более 0,5 %. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение воды» из точной навески около 3,0 г субстанции.

Сульфатная зола. Не более 0,2 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют около 0,5 г (точная навеска) субстанции.

Тяжелые металлы. Не более 0,002 %. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Тяжёлые металлы» в зольном остатке, полученном после сжигания 0,5 г субстанции (ОФС «Сульфатная зола»).

Остаточные органические растворители. В соответствии с требованиями ОФС «Остаточные органические растворители».

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

Количественное определение. Определение проводят методом ВЭЖХ в условиях, описанных в разделе «Родственные примеси».

Испытуемый раствор. Около 0,05 г (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в ПФ, доводят объем раствора ПФ до метки и перемешивают. 5,0 мл полученного раствора

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора ПФ до метки и перемешивают.

Стандартный раствор. Около 0,05 г (точная навеска) стандартного образца амлодипина бесилата помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в ПФ, доводят объем раствора ПФ до метки и перемешивают. 5,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора ПФ до метки и перемешивают.

Стандартный раствор хроматографируют 5 раз. Относительное стандартное отклонение площади пика амлодипина должно быть не более 2 %.

Хроматографируют испытуемый и стандартный растворы.

Содержание амлодипина бесилата $C_{20}H_{25}ClN_2O_5 \cdot C_6H_6O_3S$ в субстанции в процентах (X) в пересчете на безводное, свободное от остаточных органических растворителей вещество, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot a_0 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot a_1 \cdot (100 - W)},$$

где S_1 – площадь пика амлодипина на хроматограмме испытуемого раствора;

S_0 – площадь пика амлодипина на хроматограмме стандартного раствора;

a_1 – навеска субстанции, г;

a_0 – навеска стандартного образца амлодипина бесилата, г;

W – суммарное содержание воды и остаточных органических растворителей в субстанции, %;

P – содержание $C_{20}H_{25}ClN_2O_5 \cdot C_6H_6O_3S$ в стандартном образце амлодипина бесилата, %.

Хранение. В защищенном от света месте.

Метамизол натрия	**ФС.2.1.0003.15**
Анальгин	**Взамен ФС 42-2085-95**
Metamizolum natricum	**Взамен ГФ XII, ч.1, ФС 42-0215-07**

[(1,5-Диметил-3-оксо-2-фенил-2,3-дигидро-1*H*-пиразол-4-ил)(метил)амино]метансульфонат натрия, моногидрат



$C_{13}H_{16}N_3NaO_4S \cdot H_2O$ М. м. 351,35

Содержит не менее 99,0 % и не более 101,0 % метамизола натрия $C_{13}H_{16}N_3NaO_4S$ в пересчете на сухое вещество.

Описание. Белый или почти белый кристаллический порошок без запаха.

Растворимость. Очень легко растворим в воде, умеренно растворим в спирте 96 %, практически нерастворим в хлороформе.

Подлинность. *1. ИК-спектр.* Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области частот от 4000 до 400 $см^{-1}$ по положению полос поглощения должен соответствовать рисунку спектра стандартного образца (Приложение).

2. УФ-спектр. Ультрафиолетовый спектр поглощения 0,002 % раствора

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

субстанции в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты в области длин волн от 245 до 280 нм должен иметь максимум поглощения при 258 нм.

3. Качественная реакция. 0,05 г субстанции растворяют в 1 мл водорода пероксида. Раствор должен окраситься в слегка голубой цвет, который быстро исчезает и через несколько минут раствор становится красным.

4. *Качественная реакция.* 0,1 г субстанции смачивают 0,1 мл воды, прибавляют 5 мл спирта 96 % и 0,5 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 %. После растворения субстанции прибавляют 5 мл 0,1 М раствора калия йодата; раствор должен окраситься в малиновый цвет; при дальнейшем прибавлении реактива окраска усиливается и выделяется бурый осадок.

5. Качественная реакция. Субстанция дает характерную реакцию Б на натрий (ОФС «Общие реакции на подлинность»).

***Прозрачность раствора.** Раствор 0,5 г субстанции в 5 мл свежепрокипяченной и охлажденной воды должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

***Цветность раствора.** 6,25 г субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора свежепрокипяченной и охлажденной водой до метки и перемешивают (испытуемый раствор). Не более чем через 10 мин проводят испытание одним из методов.

А. Окраска испытуемого раствора не должна превышать эталон GY_6 (ОФС «Степень окраски жидкостей»).

Б. Оптическая плотность испытуемого раствора, измеренная в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 400 нм относительно воды, должна быть не более 0,1.

pH. От 6,0 до 7,5 (10 % раствор, ОФС «Ионометрия», метод 3).

Родственные примеси. Определение проводят методом ВЭЖХ.

Буферный раствор pH 7,0. 6,0 г натрия фосфата однозамещенного растворяют в 1000 мл воды, прибавляют 1 мл триэтиламина и доводят pH

Федеральный электронный медицинский библиотека ВЭМБ

раствора до 7,0 ± 0,1 с помощью 10 % раствора натрия гидроксида.

Испытуемый раствор. 0,050 г субстанции растворяют в 10 мл метанола. Раствор анализируют тотчас же.

0,05 % раствор 4-аминоантипирина. 0,010 г 4-аминоантипирина (4-амино-1,5-диметил-2-фенил-1,2-дигидро-3*H*-пиразол-3-он) растворяют в 20 мл метанола.

Раствор сравнения. 1 мл 0,05 % раствора 4-аминоантипирина разводят метанолом до 20 мл.

Раствор для проверки пригодности хроматографической системы. 0,02 г субстанции растворяют в 10 мл метанола и кипятят с обратным холодильником в течение 10 мин, охлаждают и разводят метанолом до 20 мл. К 5 мл полученного раствора прибавляют 5 мл 0,05 % раствора 4-аминоантипирина и перемешивают.

Условия хроматографирования

Колонка	25 см × 0,46 см с октадецилсилил силикагелем (C_{18}), 5 мкм;
Подвижная фаза (ПФ)	буферный раствор с pH 7 – метанол (72:28);
Скорость потока	1,0 мл/мин;
Детектор	спектрофотометрический, 254 нм;
Объем пробы	10 мкл.

Хроматографируют раствор для проверки пригодности хроматографической системы. На хроматограмме должно наблюдаться 3 пика с относительными временами удерживания 1,0 (анальгин), около 1,4 (4-аминоантипирин) и около 2,0 (4-метиламиноантипирин). Разрешение (*R*) между пиками метамизола и 4-аминоантипирина должно быть не менее 2,2; между пиками 4-аминоантипирина и 4-метиламиноантипирина – не менее 3,0.

Последовательно хроматографируют раствор сравнения и испытуемый раствор. Время регистрации хроматограммы испытуемого раствора должно

не менее чем в 1,5 раза превышать время удерживания пика 4-метиламиноантипирина.

На хроматограмме испытуемого раствора площадь пика 4-метиламиноантипирина должна быть не более площади пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,5 %), площадь пика любой другой примеси должна быть не более 40 % от площади пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,2 %), суммарная площадь пиков примесей должна быть не более площади пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,5 %). Не учитывают пики, площадь которых составляет 5 % и менее от площади пика на хроматограмме раствора сравнения (менее 0,025 %).

Потеря в массе при высушивании. От 4,7 % до 5,5 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Для определения используют около 0,5 г (точная навеска) субстанции.

Хлориды. 0,5 г субстанции помещают в коническую колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 10 мл воды, прибавляют 5 мл азотной кислоты разведенной 16 % и осторожно кипятят в течение 5 мин. После охлаждения раствор переносят в пробирку, содержащую 0,15 мл 0,1 М раствора серебра нитрата, доводят объем раствора водой до 10 мл и через 1 мин просматривают в проходящем свете.

Параллельно проводят контрольный опыт.

Не должно быть опалесценции, превышающей опалесценцию, наблюдаемую в контрольном опыте.

Примечание. Раздел «Хлориды» вводят при необходимости в зависимости от способа получения субстанции.

Сульфаты. Не более 0,1 % (ОФС «Сульфаты»). 0,1 г субстанции растворяют в 10 мл воды.

Тяжелые металлы. Не более 0,002 %. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Тяжёлые металлы» в зольном остатке, полученном после сжигания 0,5 г субстанции (ОФС «Сульфатная зола»).

Остаточные органические растворители. В соответствии с

требованиями ОФС «Остаточные органические растворители».

***Бактериальные эндотоксины.** Не более 0,14 ЕЭ на 1 мг метамизола натрия. Для проведения испытания готовят исходный раствор субстанции 10 мг/мл, а затем разводят его не менее чем в 4 раза.

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

Количественное определение. Около 0,15 г (точная навеска) субстанции помещают в сухую колбу, прибавляют 20 мл спирта 96 %, 5 мл 0,01 М раствора хлористоводородной кислоты и тотчас титруют 0,05 М раствором йода при перемешивании до появления желтой окраски, не исчезающей в течение 30 с.

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,05 М раствора йода соответствует 16,67 мг метамизола натрия $C_{13}H_{16}N_3NaO_4S$.

Хранение. В защищенном от света месте.

*Контроль по показателям качества «Прозрачность раствора», «Цветность раствора» и «Бактериальные эндотоксины» проводят в субстанциях, предназначенных для производства лекарственных препаратов для парентерального применения.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Умифеновира гидрохлорид	**ФС.2.1.0004.15**
Арбидол	**Взамен ФС 42-3151-95;**
Umifenoviri hydrochloridum	**взамен ГФ XII, ч.1, ФС 42-0216-07**

Этил[6-бром-5-гидрокси-4-[(диметиламино)метил]-1-метил-2-[(фенилсульфанил)метил]индол-3-карбоксилата] гидрохлорид



$C_{22}H_{25}BrN_2O_3S \cdot HCl \cdot H_2O$ М. м. 531,9

М. м. 513,9 (безводный)

Содержит не менее 99,0 % и не более 101,0 % умифеновира гидрохлорида $C_{22}H_{25}BrN_2O_3S \cdot HCl$ в пересчете на безводное вещество.

Описание. Белый или почти белый кристаллический порошок.

Растворимость. Мало растворим в хлороформе и спирте 96 %, практически нерастворим в воде.

Подлинность. 1. *ИК-спектр.* Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области частот от 4000 до 400 $см^{-1}$ по положению полос поглощения должен соответствовать рисунку спектра стандартного образца (Приложение).

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

2. *УФ-спектр.* Ультрафиолетовый спектр поглощения 0,001 % раствора субстанции в смеси спирт 96 % – 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты (9:1) в области длин волн от 210 до 400 нм должен иметь максимумы поглощения при 225 нм, 255 нм и 316 нм и минимумы поглощения при 244 нм и 284 нм.

3. Качественные реакции. 0,1 г субстанции смешивают в фарфоровом тигле с 0,5 г смеси для спекания (см. ОФС «Реактивы. Индикаторы») и прокаливают. По охлаждении остаток растворяют в 10 мл воды и фильтруют.

2 мл фильтрата дают характерную реакцию А на бромиды.

2 мл фильтрата дают характерную реакцию на сульфаты.

Определения проводят в соответствии с ОФС «Общие реакции на подлинность».

4. Качественная реакция. 0,1 г субстанции встряхивают с 5 мл азотной кислоты разведенной 16 % и фильтруют. Полученный фильтрат дает характерную реакцию на хлориды (ОФС «Общие реакции на подлинность»).

Родственные примеси. Определение проводят методом тонкослойной хроматографии (ТСХ).

Испытуемый раствор. 0,05 г субстанции растворяют в 5 мл метанола.

Раствор сравнения. 1 мл испытуемого раствора разбавляют метанолом до 100 мл.

Немедленно после приготовления растворов на линию старта пластинки со слоем силикагеля 60 F_{254} наносят 20 мкл (200 мкг) испытуемого раствора, 10 мкл (1 мкг) и 5 мкл (0,5 мкг) раствора сравнения. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру со смесью хлороформ – ацетон – диэтиламин (5:4:1) и хроматографируют восходящим методом. Когда фронт подвижной фазы пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат при температуре 120 °С в течение 10 мин и просматривают в УФ-свете при 254 нм.

Суммарное содержание родственных примесей, оцененное по интенсивности поглощения и величине их пятен на хроматограмме

испытуемого раствора в сравнении с пятнами на хроматограммах раствора сравнения, не должно превышать 0,5 %.

Допускается пятно на линии старта (диэтиламмония хлорид).

Результаты испытания считаются достоверными, если на хроматограмме раствора сравнения, содержащего 0,5 мкг субстанции, четко видно пятно.

Вода. Не менее 3,0 % и не более 4,0 % (ОФС «Определение воды»). Для определения используют около 0,5 г (точная навеска) субстанции.

Сульфатная зола. Не более 0,1 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

Тяжелые металлы. Не более 0,001 %. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Тяжёлые металлы» в зольном остатке, полученном после сжигания 1,0 г субстанции (ОФС «Сульфатная зола»).

Остаточные органические растворители. В соответствии с требованиями ОФС «Остаточные органические растворители».

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

Количественное определение. Около 0,5 г (точная навеска) субстанции растворяют в 1 мл муравьиной кислоты, прибавляют 30 мл уксусного ангидрида и титруют 0,1 М раствором хлорной кислоты до желтого окрашивания (индикатор – 0,5 мл 0,1 % раствора кристаллического фиолетового).

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,1 М раствора хлорной кислоты соответствует 51,39 мг умифеновира гидрохлорида $C_{22}H_{25}BrN_2O_3S \cdot HCl$.

Хранение. В защищенном от света месте.

Артикаина гидрохлорид	**ФС.2.1.0005.15**
Артикаина гидрохлорид	**Взамен ФС 42-0061-01;**
Articaini hydrochloridum	**взамен ГФ XII, ч. 1, ФС 42-0217-07**

Метил{4-метил-3-[(2*RS*)-2-(пропиламино)пропанамидо]тиофен-2-карбоксилата} гидрохлорид



$C_{13}H_{20}N_2O_3S \cdot HCl$ М. м. 320,84

Содержит не менее 98,5 % и не более 101,0 % артикаина гидрохлорида $C_{13}H_{10}N_2O_3S \cdot HCl$ в пересчете на сухое и свободное от остаточных органических растворителей вещество.

Описание. Белый или белый с желтовато-зеленоватым оттенком кристаллический порошок.

Растворимость. Легко растворим в воде, растворим или легко растворим в спирте 96 %, мало растворим в ацетоне.

Подлинность.

1. ИК-спектр. Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области частот от 4000 до 400 $см^{-1}$ по положению полос поглощения должен соответствовать рисунку спектра стандартного образца

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

артикаина гидрохлорида (Приложение).

2. УФ-спектр. Ультрафиолетовый спектр поглощения 0,002 % раствора субстанции в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты в области длин волн от 200 до 350 нм должен иметь максимум поглощения при 272 нм и минимум при 230 нм.

3. Субстанция дает характерную реакцию на хлориды (ОФС «Общие реакции на подлинность»).

Температура плавления. От 167 до 172 °С (начало разложения, ОФС «Температура плавления»).

Прозрачность раствора. Раствор 1 г субстанции в 20 мл воды должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

Цветность раствора. Окраска раствора, полученного в испытании на «Прозрачность раствора», не должна превышать эталон BY_6 (ОФС «Степень окраски жидкостей»).

pH. От 4,2 до 5,2 (1 % раствор, ОФС «Ионометрия», метод 3).

Родственные примеси. Определение проводят методом ВЭЖХ.

0,01 М раствор натрия гептилсульфоната, pH 2,0. 2,02 г натрия гептилсульфоната и 4,08 г калия фосфата однозамещенного растворяют в 900 мл воды, доводят pH раствора до 2,0 ± 0,1 ортофосфорной кислотой и доводят объем раствора водой до 1000 мл.

Испытуемый раствор. Около 0,01 г субстанции (точная навеска) помещают в мерную колбу на 10 мл, растворяют в подвижной фазе (ПФ) и доводят объём до метки тем же растворителем.

Раствор примесей. Около 0,01 г стандарта (точная навеска) примеси «ацетамидоартикаин» (метил{4-метил-3-[2-(пропиламино)ацетамидо]тиофен-2-карбоксилат}) и около 0,005 г стандарта (точная навеска) примеси «изопропилартикаин» (метил{4-метил-3-[(*2RS*)-2-[(пропан-2-ил)амино]пропанамидо]тиофен-2-карбоксилат}) помещают в мерную колбу объёмом 100 мл, растворяют в подвижной фазе (ПФ, ацетонитрил – 0,01 М раствор натрия гептилсульфоната с pH 2,0 (25:75)) и доводят раствор до

метки тем же растворителем.

Раствор для проверки пригодности хроматографической системы. Около 10 мг субстанции (точная навеска) помещают в мерную колбу на 10 мл, растворяют в 8 мл подвижной фазы (ПФ), прибавляют 0,2 мл раствора примесей, перемешивают и доводят раствор до метки подвижной фазой.

Раствор сравнения А. 1,0 мл испытуемого раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора ПФ до метки и перемешивают. 1,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора ПФ до метки и перемешивают.

Раствор сравнения Б. 1,0 мл раствора примесей переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора ПФ до метки и перемешивают.

Хроматографические условия

Колонка	15 см × 0,39 см с октадецилсилилсиликагелем (С18), 5 мкм;
Подвижная фаза (ПФ)	ацетонитрил – 0,01 М раствор натрия гептилсульфоната с pH 2,0 (25:75);
Температура	45 ºС;
Скорость потока	1,0 мл/мин;
Детектор	спектрофотометрический, 276 нм;
Объем пробы	10 мкл.

Хроматографируют раствор для проверки пригодности хроматографической системы. Относительное время удерживания пика примеси «ацетамидоартикаин» – около 0,8, пика примеси «изопропилартикаин» – около 0,86, пика артикаина – 1,0. Разрешение (*R*) между пиками примесей «ацетамидоартикаин» и «изопропилартикаин» должно быть не менее 1,2.

Хроматографируют раствор сравнения А, раствор сравнения Б и испытуемый раствор. Время регистрации хроматограммы испытуемого раствора должно не менее чем в 5 раз превышать время удерживания

основного пика.

На хроматограмме испытуемого раствора площадь пика примеси «ацетамидоартикаин» должна быть не более площади пика примеси «ацетамидоартикаин» на хроматограмме раствора сравнения Б (не более 0,2 %); площадь пика любой другой примеси должна быть не более площади пика на хроматограмме раствора сравнения А (не более 0,1 %); суммарная площадь пиков любых других примесей не должна более чем в 5 раз превышать площадь пика на хроматограмме раствора сравнения А (не более 0,5 %). Не учитывают пики, площадь которых составляет менее половины площади пика на хроматограмме раствора сравнения А (менее 0,05 %).

Потеря в массе при высушивании. Не более 0,5 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Для определения используют около 0,5 г (точная навеска) субстанции.

Сульфатная зола. Не более 0,1 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют около 0,5 г (точная навеска) субстанции.

Тяжелые металлы. Не более 0,002%. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Тяжёлые металлы» в зольном остатке, полученном после сжигания 0,5 г субстанции (ОФС «Сульфатная зола»).

Остаточные органические растворители. В соответствии с требованиями ОФС «Остаточные органические растворители».

Бактериальные эндотоксины. Не более 0,7 ЕЭ на 1 мг артикаина гидрохлорида (ОФС «Бактериальные эндотоксины»). Для проведения испытания готовят исходный раствор субстанции 40 мг/мл, а затем разводят его не менее чем в 30 раз.

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

Количественное определение. К около 0,2 г (точная навеска) субстанции прибавляют 10 мл уксусной кислоты ледяной и 4 мл раствора ртути(II) ацетата, перемешивают до растворения навески, прибавляют 0,1 мл 0,1 % раствора кристаллического фиолетового и титруют 0,1 М раствором

хлорной кислоты. В конце титрования (при первом изменении цвета индикатора) прибавляют 10 мл уксусного ангидрида и продолжают титрование до появления голубовато-зеленого окрашивания.

Параллельно проводят контрольный опыт.

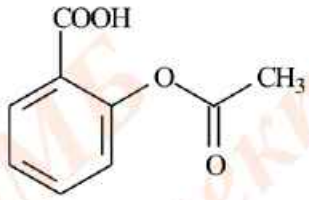
1 мл 0,1 М раствора хлорной кислоты соответствует 32,08 мг артикаина гидрохлорида $C_{13}H_{10}N_2O_3S \cdot HCl$.

Хранение. В защищенном от света месте.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Ацетилсалициловая кислота	**ФС.2.1.0006.15**
Аспирин	**Взамен ФС 42-0040-00;**
Acidum acetylsalicylicum	**взамен ГФ XII, ч. 1, ФС 42-0220-07**

2-(Ацетилокси)бензойная кислота



$C_9H_8O_4$ М. м. 180,16

Содержит не менее 99,5 % ацетилсалициловой кислоты $C_9H_8O_4$ в пересчете на сухое и свободное от остаточных органических растворителей вещество.

Описание. Белый или почти белый кристаллический порошок или бесцветные кристаллы без запаха или со слабым запахом.

Растворимость. Легко растворим в спирте 96 %, растворим в хлороформе, мало растворим в воде.

Подлинность

1. *ИК-спектр.* Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области частот от 4000 до 400 $см^{-1}$, по положению полос поглощения должен соответствовать рисунку спектра стандартного образца ацетилсалициловой кислоты (Приложение).

2. *УФ-спектр.* Ультрафиолетовый спектр поглощения 0,007 % раствора

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

субстанции в хлороформе в области от 260 до 350 нм дожен иметь максимум поглощения при 278 нм.

3. УФ-спектр. Ультрафиолетовый спектр поглощения 0,001 % раствора субстанции в 0,1 М растворе серной кислоты в области от 220 до 350 нм должен иметь максимумы поглощения при 228 нм и 276 нм и минимум поглощения при 257 нм.

4. Качественная реакция. 0,5 г субстанции кипятят в течение 3 мин с 5 мл раствора натрия гидроксида, охлаждают, нейтрализуют серной кислотой разведенной 16 %; образуется белый кристаллический осадок. К осадку прибавляют 0,1 мл раствора железа(III) хлорида; должно появиться фиолетовое окрашивание.

5. Качественная реакция. К 0,2 г субстанции прибавляют 0,5 мл серной кислоты концентрированной, перемешивают, прибавляют 0,1 мл воды; должен появиться запах уксусной кислоты. Прибавляют 0,1 мл формалина; должно появиться розовое окрашивание.

Прозрачность раствора. Раствор 2 г субстанции в 20 мл спирта 96 % должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

Цветность раствора. Раствор, полученный в испытании на «Прозрачность раствора», должен быть бесцветным (ОФС «Степень окраски жидкостей»).

Вещества, нерастворимые в растворе натрия карбоната. 0,5 г субстанции растворяют в 10 мл теплого 10 % раствора натрия карбоната. Полученный раствор должен быть прозрачным.

Родственные примеси. Определение проводят методом ВЭЖХ.

Испытуемый раствор. Около 0,1 г субстанции (точная навеска) помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в ацетонитриле и доводят объем раствора ацетонитрилом до метки.

Раствор сравнения. Около 0,05 г стандартного образца салициловой кислоты (точная навеска) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл,

ВЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

растворяют в подвижной фазе (ПФ) и доводят объем раствора ПФ до метки. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем раствора ПФ до метки.

Раствор для проверки пригодности хроматографической системы. 0,01 г стандартного образца салициловой кислоты растворяют в 10 мл ПФ. 1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 0,2 мл испытуемого раствора и доводят объем раствора ПФ до метки.

Используют свежеприготовленные растворы.

Хроматографические условия

Колонка	15 × 0,46 см с октадецилсилилсиликагелем (С18), 5 мкм;
ПФ	фосфорная кислота концентрированная – ацетонитрил – вода (1:200:300);
Скорость потока	1,0 мл/мин;
Детектор	спектрофотометрический, 237 нм;
Объем пробы	10 мкл.

Хроматографируют раствор для проверки пригодности хроматографической системы. Разрешение (*R*) между пиками ацетилсалициловой кислоты и салициловой кислоты должно быть не менее 6.

Хроматографируют испытуемый раствор и раствор сравнения. Время регистрации хроматограммы испытуемого раствора должно не менее чем в 7 раз превышать время удерживания ацетилсалициловой кислоты.

На хроматограмме испытуемого раствора площадь пика любой примеси должна быть не более площади пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,1 %); суммарная площадь пиков примесей должна не более чем в 2,5 раза превышать площадь пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,25 %).

Хлориды. Не более 0,004 % (ОФС «Хлориды»). 1,5 г субстанции взбалтывают в течение 2 мин с 30 мл воды и фильтруют, отбирают для

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

анализа 10 мл фильтрата.

Сульфаты. Не более 0,02 % (ОФС «Сульфаты»). Для анализа отбирают 10 мл фильтрата, полученного в испытании на «Хлориды».

Потеря в массе при высушивании. Не более 0,5 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1, температура от 80 до 85 ºС). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

Сульфатная зола. Не более 0,1 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют около 0,5 г (точная навеска) субстанции.

Тяжелые металлы. Не более 0,002 %. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Тяжёлые металлы» в зольном остатке, полученном после сжигания 0,5 г субстанции (ОФС «Сульфатная зола»).

Остаточные органические растворители. В соответствии с требованиями ОФС «Остаточные органические растворители».

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

Количественное определение. Около 0,5 г субстанции (точная навеска) растворяют в 10 мл нейтрализованного по фенолфталеину и охлажденного до температуры 8 – 10 ºС спирта 96 % и титруют 0,1 М раствором натрия гидроксида до появления розового окрашивания (индикатор – 0,1 мл 1 % раствора фенолфталеина).

Параллельно проводят контрольный опыт.

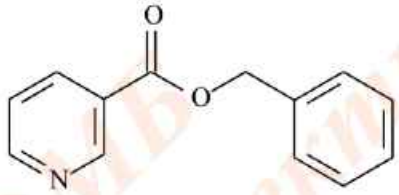
1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида соответствует 18,02 мг ацетилсалициловой кислоты $C_9H_8O_4$.

Хранение. В плотно укупоренной упаковке.

Фармакопея Электронная медицинская библиотека

Бензилникотинат	**ФС.2.1.0007.15**
Бензилникотинат	
Benzylis nicotinas	**Взамен ФС 42-2160-84**

Бензил(пиридин-3-карбоксилат)



$C_{13}H_{11}NO_2$ М. м. 213,23

Содержит не менее 97,0 % бензилникотината $C_{13}H_{11}NO_2$.

Описание. Маслянистая жидкость от желтоватого до желтовато-коричневого или слабо красноватого цвета с характерным запахом. Может кристаллизоваться при температуре ниже 24 °С.

Растворимость. Практически нерастворим в воде, смешивается со спиртом 96 % и хлороформом.

Подлинность

1. ИК-спектр. Инфракрасный спектр пленки субстанции, снятый между пластинками калия бромида в области частот от 4000 до 400 $см^{-1}$, по положению полос поглощения должен соответствовать рисунку спектра стандартного образца бензилникотината (Приложение).

2. Качественная реакция. К 1 капле субстанции прибавляют 0,5 г натрия карбоната безводного и нагревают на пламени горелки; образуется бензальдегид, обнаруживаемый по характерному запаху.

ФЭМБ Электронная библиотека

3. Качественная реакция. 0,6 г субстанции растворяют в 5 мл спирта 96 %, прибавляют 1 мл 10 % раствора натрия гидроксида и кипятят в течение 3 мин. Охлажденный раствор нейтрализуют 1 М раствором уксусной кислоты по фенолфталеину, затем прибавляют 0,5 мл 10 % раствора меди(II) сульфата; должен образоваться синий осадок.

Показатель преломления. От 1,569 до 1,571 (ОФС «Рефрактометрия»).

Никотиновая кислота. Не более 1,7%.

Около 0,6 г субстанции (точная навеска) растворяют в 5 мл предварительно нейтрализованного по фенолфталеину спирта 96 % и титруют с тем же индикатором 0,01 М раствором натрия гидроксида до розового окрашивания.

1 мл 0,01 М раствора натрия гидроксида соответствует 1,231 мг бензилникотината $C_6H_5NO_2$.

Родственные примеси. Определение проводят методом газовой хроматографии (ГХ).

Раствор для проверки пригодности хроматографической системы. 25 мг стандартного образца метилникотината растворяют в 2,5 мл субстанции.

Хроматографические условия

Колонка — капиллярная, 25 м × 0,32 мм, полидиметилсилоксан, 1,5 мкм;

Газ-носитель — азот, 4 мл/мин;

Температура колонки

Время, мин	Температура, °С
0	180
0 – 5	180 → 240
5 – 10	240

Детектор — пламенно-ионизационный;

Температура испарителя — 230 °С;

Температура детектора — 250 °С;

Объём пробы — 0,8 мкл.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Хроматографируют раствор для проверки пригодности хроматографической системы. Разрешение (*R*) между пиками метилникотината и бензилникотината должно составлять не менее 5,0.

Хроматографируют субстанцию в течение времени, в 2 раза превышающего время удерживания основного пика.

На хроматограмме испытуемого раствора площадь пика любой примеси должна быть не более 0,5 % от суммарной площади пиков (не более 0,5 %); суммарная площадь пиков примесей должна быть не более 1,0 % от суммарной площади пиков (не более 1,0 %). Не учитывают пики, площадь которых менее 0,05 % площади основного пика.

Сульфатная зола. Не более 0,1 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

Тяжелые металлы. Не более 0,001 %. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Тяжёлые металлы» в зольном остатке, полученном после сжигания 1,0 г субстанции (ОФС «Сульфатная зола»).

Остаточные органические растворители. В соответствии с требованиями ОФС «Остаточные органические растворители».

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

Количественное определение. Около 0,2 г (точная навеска) субстанции растворяют в 20 мл уксусной кислоты ледяной и титруют 0,1 М раствором хлорной кислоты до появления зеленого окрашивания (индикатор – 0,4 мл 0,1 % раствора кристаллического фиолетового) или потенциометрически.

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,1 М раствора хлорной кислоты соответствует 21,32 мг бензилникотината $C_{13}H_{11}NO_2$.

Хранение. В защищенном от света месте.

Примечание. При работе с бензилникотинатом следует принимать меры, предохраняющие от его попадания на кожу и слизистые оболочки; работу производить в резиновых перчатках в вытяжном шкафу.

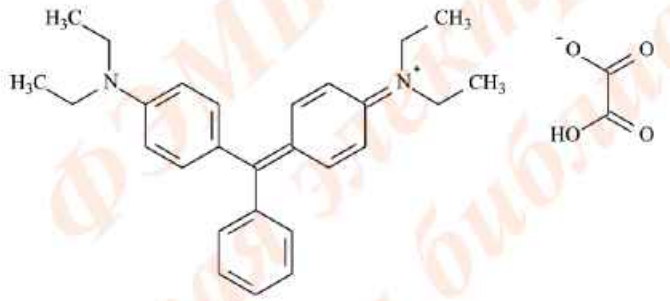
ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Бриллиантовый зеленый **ФС.2.1.0008.15**

Бриллиантовый зеленый

Viride nitens **Взамен ГФ X, ст. 733**

4-{[4-(Диэтиламино)фенил](фенил)метилен}-*N*,*N*-диэтилциклогекса-2,5-диен-1-иминия гидрооксалат



$C_{29}H_{34}N_2O_4$ М.м. 474,6

Содержит не менее 99,0 % бриллиантового зелёного $C_{29}H_{34}N_2O_4$ в пересчете на сухое вещество.

Описание. Зеленовато-золотистые комочки или золотисто-зеленый порошок.

Растворимость. Растворим в хлороформе, умеренно растворим в воде и спирте 96 %.

Подлинность. *1. Качественная реакция.* При прибавлении к 0,2 % раствору субстанции хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 %

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

должно наблюдаться оранжевое окрашивание.

2. *Качественная реакция.* При прибавлении к 0,2 % раствору субстанции 10 % раствора натрия гидроксида должно наблюдаться образование бледно-зеленого осадка.

Сульфатная зола. Не более 1,0 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

Тяжелые металлы. Не более 0,005 % (ОФС «Тяжёлые металлы»). Сульфатную золу обрабатывают при нагревании на сетке 5 мл насыщенного раствора аммония ацетата, нейтрализованного раствором натрия гидроксида 10 %, прибавляют 5 мл воды и фильтруют в пробирку через беззольный фильтр, предварительно промытый 1 % раствором уксусной кислоты, а затем горячей водой. Тигель и фильтр промывают 15 мл воды, пропуская ее через тот же фильтр в ту же пробирку. Для анализа отбирают фильтрат в объеме 5 мл, разведенный водой до 10 мл.

Мышьяк. Не более 0,0004 % (ОФС «Мышьяк», метод 1). Для определения используют навеску 0,125 г субстанции.

Потеря в массе при высушивании. Не более 3,0 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

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

Количественное определение. Около 1,0 г (точная навеска) субстанции растворяют в спирте 60 % в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем раствора спиртом 60 % до метки и перемешивают. 5,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл серной кислоты разведенной 16 %, 25,0 мл 0,05 М раствора йода, взбалтывают, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор отстаивают до получения прозрачного верхнего слоя (20 – 60 мин), затем быстро фильтруют через вату, отбрасывая первые 10 – 15 мл фильтрата. 50,0 мл полученного фильтрата титруют 0,1 М раствором

натрия тиосульфата (индикатор – 0,2 мл раствора крахмала).

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,05 М раствора йода соответствует 5,933 мг бриллиантового зелёного $C_{29}H_{34}N_2O_4$.

Хранение. В хорошо укупоренной упаковке.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Бромгексина гидрохлорид **ФС.2.1.0009.15**

Бромгексина гидрохлорид

Bromhexini hydrochloridum **Взамен ГФ XII, ч.1, ФС 42-0223-07**

2,4-Дибром-6-{[метил(циклогексил)амино]метил}анилина гидрохлорид



$C_{14}H_{20}Br_2N_2 \cdot HCl$ М. м. 412,6

Содержит не менее 98,5 % и не более 101,5 % бромгексина гидрохлорида $C_{14}H_{20}Br_2N_2 \cdot HCl$ в пересчете на сухое и свободное от остаточных органических растворителей вещество.

Описание. Белый или почти белый кристаллический порошок. Проявляет полиморфизм.

Растворимость. Очень мало растворим в воде, мало растворим в спирте 96 % и метиленхлориде.

Подлинность

1. ИК-спектр. Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области частот от 4000 до 400 $см^{-1}$ по положению полос поглощения должен соответствовать спектру стандартного образца бромгексина гидрохлорида.

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

2. Качественная реакция. 0,025 г субстанции растворяют в смеси 0,6 мл серной кислоты разведенной 16 % и 50 мл воды, прибавляют 2 мл метиленхлорида, 5 мл раствора хлорамина 5 %, встряхивают и оставляют до разделения слоев; в нижнем слое должно появиться коричнево-жёлтое окрашивание.

3. Качественная реакция. 0,001 г субстанции растворяют в 3 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты. Полученный раствор должен давать характерную реакцию на амины первичные ароматические (ОФС «Общие реакции на подлинность»).

4. Качественная реакция. 0,02 г субстанции растворяют в 1 мл метанола, прибавляют 1 мл воды и перемешивают. Полученный раствор должен давать характерную реакцию на хлориды (ОФС «Общие реакции на подлинность»).

Родственные примеси. Определение проводят методом ВЭЖХ.

Буферный раствор pH 7,0. 0,5 мл фосфорной кислоты концентрированной растворяют в 950 мл воды, доводят pH до 7,0 ± 0,1 с помощью раствора триэтиламина, доводят объем раствора водой до 1000 мл и перемешивают.

Испытуемый раствор. 0,05 г субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в метаноле и доводят тем же растворителем до метки.

Раствор сравнения. 1,0 мл испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают. 1,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают.

Раствор для проверки пригодности хроматографической системы. 0,005 г стандартного образца примеси С (2-{[метил(цикло-гексил)амино]метил}анилина) растворяют в 9 мл метанола, прибавляют 1 мл испытуемого раствора и перемешивают.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Хроматографические условия

Колонка	–	12,5 × 0,46 см с октадецилсилилсиликагелем (С18), 3 мкм;
ПФ	–	ацетонитрил – буферный раствор с pH 7,0 (80:20);
Скорость потока	–	1,0 мл/мин;
Детектор	–	спектрофотометрический, 248 нм;
Объем пробы	–	10 мкл.

Хроматографируют раствор для проверки пригодности хроматографической системы. Относительные времена удерживания компонентов: примесь С бромгексина – около 0,4; бромгексин – 1,0 (около 11 мин). Хроматографическая система считается пригодной, если разрешение (*R*) между пиками составляет не менее 12,0.

Хроматографируют раствор сравнения и испытуемый раствор. Время регистрации хроматограммы испытуемого раствора должно не менее чем в 2,5 раза превышать время удерживания основного пика.

Площадь пика только 1 примеси на хроматограмме испытуемого раствора не должна более чем в 2 раза превышать площадь пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,2 %); площадь пика любой другой примеси на хроматограмме испытуемого раствора должна быть не более площади пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,1 %); сумма площадей всех пиков примесей не должна более чем в 3 раза превышать площадь пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,3 %). Не учитывают пики, площадь которых составляет менее половины площади пика на хроматограмме раствора сравнения (0,05 %).

Потеря в массе при высушивании. Не более 1,0 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

Сульфатная зола. Не более 0,1 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

Тяжелые металлы. Не более 0,001 %. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Тяжёлые металлы» в зольном остатке, полученном после сжигания 1,0 г субстанции (ОФС «Сульфатная зола»).

Остаточные органические растворители. В соответствии с требованиями ОФС «Остаточные органические растворители».

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

Количественное определение. Около 0,3 г (точная навеска) субстанции растворяют в 70 мл спирта 96 %, прибавляют 1 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты и титруют 0,1 М раствором натрия гидроксида потенциометрически. Расход титранта определяют по разности объемов титранта между 2 точками перегиба на кривой титрования.

Параллельно проводят контрольный опыт.

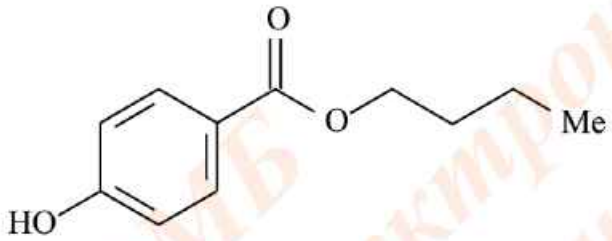
1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида соответствует 41,26 мг бромгексина гидрохлорида $C_{14}H_{20}Br_2N_2 \cdot HCl$.

Хранение. В защищенном от света месте.

Федеральная электронная медицинская библиотека

Бутилпарагидроксибензоат	**ФС.2.1.0010.15**
Бутилпарагидроксибензоат	
Butylis parahydroxybenzoas	**Взамен ФС 42-0199-07**

Бутил(4-гидроксибензоат)



$C_{11}H_{14}O_3$ М. м. 194,23

Содержит не менее 98,0 % и не более 102,0 % бутилпарагидроксибензоата $C_{11}H_{14}O_3$.

Описание. Белый или почти белый кристаллический порошок или бесцветные кристаллы.

Растворимость. Легко растворим в спирте 96 % и ацетоне, очень мало растворим в воде.

Подлинность

1. *ИК-спектр.* Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом в области от 4000 до 400 см $^{-1}$, по положению полос поглощения должен соответствовать спектру стандартного образца бутилпарагидроксибензоата.

2. *ТСХ.* Основное пятно на хроматограмме испытуемого раствора Б, полученной в испытании «Родственные примеси», по положению, величине

Федеральный ФЭМБ электронной медицинская библиотека

и интенсивности поглощения должно соответствовать пятну на хроматограмме раствора сравнения Б бутилпарагидроксибензоата.

Температура плавления. От 68 до 71 °С (ОФС «Температура плавления»). Субстанцию предварительно сушат в вакууме в эксикаторе над безводным силикагелем в течение 24 ч.

Кислотность. 0,2 г субстанции растворяют в 5 мл спирта 96 %, прибавляют 5 мл воды и 0,1 мл 0,05 % раствора бромкрезолового зеленого. Окраска раствора должна измениться от прибавления не более 0,1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида.

Родственные примеси. Определение проводят методом тонкослойной хроматографии (ТСХ).

Испытуемый раствор А. Около 0,1 г субстанции (точная навеска) помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в ацетоне, доводят объем раствора ацетоном до метки и перемешивают.

Испытуемый раствор Б. 1,0 мл испытуемого раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора ацетоном до метки и перемешивают.

Раствор сравнения А. 0,5 мл испытуемого раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора ацетоном до метки и перемешивают.

Раствор сравнения Б. 0,01 г стандартного образца бутилпарагидроксибензоата помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в ацетоне, доводят объем раствора ацетоном до метки и перемешивают.

Раствор сравнения В. 0,01 г пропилпарагидроксибензоата [пропил(4-гидроксибензоата)] помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, прибавляют 1 мл испытуемого раствора А, доводят объем раствора ацетоном до метки и перемешивают.

На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля КС 18 F_{254} или аналогичного наносят по 2 мкл испытуемого раствора А

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

(20 мкг), испытуемого раствора Б (2 мкг), раствора сравнения А (0,1 мкг), раствора сравнения Б (2 мкг стандартного образца бутилпарагидроксибензоата) и раствора сравнения В (по 2 мкг стандартного образца бутилпарагидроксибензоата и пропилпарагидроксибензоата).

Пластинку сушат на воздухе в течение 5 мин, помещают в камеру со смесью растворителей уксусная кислота ледяная – вода – метанол (1:30:70) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт подвижной фазы пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и просматривают в УФ свете при длине волны 254 нм.

На хроматограмме испытуемого раствора А, кроме основного пятна, не должно быть пятен, по величине и интенсивности поглощения превышающих основное пятно на хроматограмме раствора сравнения А (не более 0,5 %).

Пятно на линии старта не учитывают.

Результаты анализа считаются достоверными, если на хроматограмме раствора сравнения В четко обнаруживаются 2 пятна.

Сульфатная зола. Не более 0,1 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

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

Количественное определение. Около 1 г (точная навеска) субстанции помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 20,0 мл 1 М раствора натрия гидроксида, нагревают полученный раствор с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 1 ч и охлаждают. Холодильник промывают 5 мл воды, прибавляя их к охлажденному раствору. Избыток щелочи титруют 0,5 М раствором серной кислоты потенциометрически, определяя точку эквивалентности по второму перегибу на кривой титрования.

Параллельно проводят контрольный опыт.

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

1 мл 1 М раствора натрия гидроксида соответствует 194,2 мг бутилпарагидроксибензоата $C_{11}H_{14}O_3$.

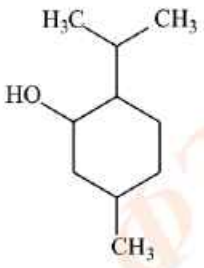
Хранение. В хорошо укупоренной упаковке.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Валидол	**ФС.2.1.0011.15**
Раствор ментола в ментилизовалерате	**Взамен ГФ X, ст. 728;**
Validolum	**взамен ФС 42-0082-02**

5-Метил-2-(пропан-2-ил)циклогексанол (ментол)

[5-Метил-2-(пропан-2-ил)циклогексил](3-метилбутаноат) (ментилизовалерат)



$C_{10}H_{20}O$ М. м. 156,27



$C_{15}H_{28}O_2$ М. м. 240,38

Содержит не менее 21,0 % и не более 31,0 % ментола ($C_{10}H_{20}O$) и не менее 68,5 % и не более 75,0 % ментилизовалерата ($C_{15}H_{28}O_2$).

Описание. Прозрачная бесцветная или слегка окрашенная маслянистая жидкость с запахом ментола.

Растворимость. Смешивается со спиртом 96 % и хлороформом, не смешивается с водой.

Подлинность. *1. ВЭЖХ.* На хроматограмме испытуемого образца время удерживания первого из 2 основных пиков должно соответствовать времени удерживания пика ментола, второго пика – времени удерживания пика ментилизовалерата на хроматограмме стандартного раствора (см. раздел «Родственные примеси»).

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

2. Качественная реакция. 1 г субстанции растворяют в 1 мл серной кислоты концентрированной, прибавляют 1 мл раствора ванилина в серной кислоте, перемешивают и прибавляют 1 мл воды; должно появиться малиново-красное окрашивание и характерный запах изовалериановой кислоты.

Показатель преломления. От 1,4490 до 1,4515 (ОФС «Рефрактометрия»).

Кислотность. 5 г субстанции смешивают с 10 мл спирта 96 %, нейтрализованного по фенолфталеину и прибавляют 0,05 мл 1 % раствора фенолфталеина; розовое окрашивание должно появляться от прибавления не более 0,1 мл 0,05 М раствора натрия гидроксида.

Нелетучий остаток. Не более 0,1 %. Около 1 г (точная навеска) субстанции выпаривают на водяной бане досуха.

Родственные примеси. Определение проводят методом газовой хроматографии (ГХ) одновременно с количественным определением ментола и ментилизовалерата.

Стандартный раствор. Около 2,5 г (точная навеска) стандартного образца ментола растворяют в 7,0 г (точная навеска) стандартного образца ментилизовалерата.

Хроматографические условия

Колонка		300 × 0,3 см с 5 % Reoplex-400 на Инертоне-супер или Хроматоне N-AW (0,15 – 0,20 мм), или другом аналогичном твердом носителе;
Температура:	колонки	130 °С;
	испарителя	165 °С;
	детектора	190 °С;
Расход:	газа-носителя (азот)	25 мл/мин;
	воздуха	500 мл/мин;
	водорода	30 мл/мин;
Детектор		Пламенно-ионизационный;

ФЭМБ Федеральный электронный медицинский библиотека

Объем пробы 1 мкл.

Хроматографируют стандартный раствор, получая не менее 5 хроматограмм.

При указанных условиях порядок выхода следующий: ментол, ментилизовалерат.

Хроматографическая система считается пригодной, если разрешение между пиками ментола и ментилизовалерата не менее 2; относительные стандартные отклонения для площадей пиков ментола и ментилизовалерата не более 2 % и 3 %, соответственно.

Хроматографируют испытуемый образец.

Содержание примесей в субстанции в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{\sum S_i \cdot 100}{\sum S_i + S_1 + S_2}$$

где $\sum S_i$ – сумма площадей пиков всех примесей;
S_1 – площадь пика ментола;
S_2 – площадь пика ментилизовалерата.

Содержание примесей должно быть не более 4,0 %.

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

Количественное определение. Около 0,7 г (точная навеска) субстанции помещают в колбу с обратным холодильником, прибавляют 10 мл 12 % раствора уксусного ангидрида в безводном пиридине. Нагревают с обратным холодильником на песчаной бане при слабом кипении в течение 2 ч, затем прибавляют через холодильник 25 мл воды и, по охлаждении, титруют образовавшуюся уксусную кислоту 0,5 М раствором натрия гидроксида (индикатор – 0,05 мл 1 % раствора фенолфталеина).

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,5 М раствора натрия гидроксида соответствует 78,14 мг ментола $C_{10}H_{20}O$.

Федеральная электронная медицинская библиотека

Хранение. В плотно укупоренной упаковке, при температуре не выше 15 °С.

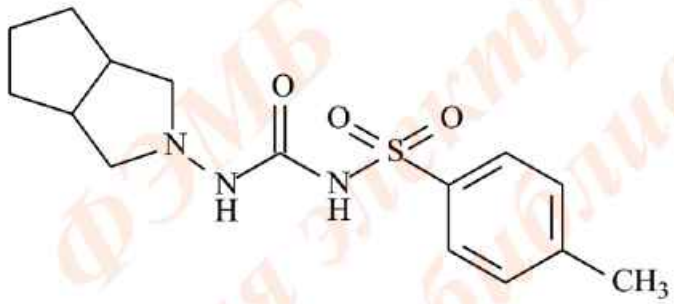
ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Гликлазид **ФС.2.1.0012.15**

Гликлазид

Gliclazidum **Взамен ГФ XII, ч.1, ФС 42-0228-07**

1-[Гексагидроциклопента[*c*]пиррол-1(2*H*)-ил]-3-[(4-метилфенил)сульфонил]мочевина



$C_{15}H_{21}N_3O_3S$ М. м. 323,41

Содержит не менее 99,0 % и не более 101,0 % гликлазида $C_{15}H_{21}N_3O_3S$ в пересчете на сухое и свободное от остаточных органических растворителей вещество.

Описание. Белый или почти белый кристаллический порошок.

Растворимость. Легко растворим в метиленхлориде, умеренно растворим в ацетоне, мало растворим в спирте 96 %, практически нерастворим в воде.

Подлинность. *ИК-спектр.* Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области частот от 4000 до 400 $см^{-1}$ по положению полос поглощения должен соответствовать спектру стандартного образца

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

гликлазида.

Родственные примеси. Определение проводится методом ВЭЖХ.

Подвижная фаза (ПФ). Триэтиламин – трифторуксусная кислота – ацетонитрил – вода (0,1:0,1:45:55).

Испытуемый раствор. Около 0,05 г субстанции (точная навеска) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 25 мл ацетонитрила и доводят объем раствора водой до метки.

Раствор сравнения А. 1,0 мл испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора смесью ацетонитрил – вода (9:11) до метки и перемешивают. 10,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора смесью ацетонитрил – вода (9:11) до метки и перемешивают.

Раствор сравнения Б. Около 0,01 г (точная навеска) стандартного образца примеси F (1-(гексагидроциклопента[*c*]пиррол-2(1*H*)-ил)-3-[(2-метилфенил)сульфонил]мочевина) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 45 мл ацетонитрила и доводят объем раствора водой до метки. 1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора смесью ацетонитрил – вода (9:11) до метки и перемешивают.

Раствор для проверки пригодности хроматографической системы. 0,005 г субстанции и 0,015 г стандартного образца примеси F растворяют в 25 мл ацетонитрила и разбавляют водой до 50 мл. 1 мл полученного раствора разбавляют смесью ацетонитрил – вода (9:11) до 20 мл и перемешивают.

Хроматографические условия

Колонка	25 × 0,4 см, с октилсилилсиликагелем (С8), 5 мкм;
Скорость потока	0,9 мл/мин;
Детектор	спектрофотометрический, 235 нм;
Объем пробы	20 мкл.

Хроматографируют раствор для проверки пригодности хроматографической системы. Разрешение (*R*) между пиками гликлазида и

примеси F должно быть не менее 1,8.

Хроматографируют растворы сравнения и испытуемый раствор и определяют площади пиков. Время регистрации хроматограммы испытуемого раствора должно не менее чем в 2 раза превышать время удерживания основного пика.

Площадь пика примеси F на хроматограмме испытуемого раствора должна быть не более площади пика на хроматограмме раствора сравнения Б (не более 0,1 %).

Площадь пика любой другой примеси на хроматограмме испытуемого раствора должна быть не более площади пика гликлазида на хроматограмме раствора сравнения А (не более 0,1 %). Сумма площадей этих пиков на хроматограмме испытуемого раствора должна не более чем вдвое превышать площадь пика на хроматограмме раствора сравнения А (не более 0,2 %).

2-Нитрозооктагидроциклопента[*c*]пиррол (Примесь В). Определение проводят методом ВЭЖХ в соответствии с условиями, описанными в разделе «Родственные примеси».

Испытуемый раствор. 0,4 г субстанции растворяют в 2,5 мл диметилсульфоксида, разбавляют водой до 10 мл, перемешивают в течение 10 мин, выдерживают при температуре 4 °С в течение 30 мин и фильтруют.

Раствор сравнения. 0,02 г стандартного образца примеси В (2-нитрозооктагидроциклопента[*c*]пиррола) растворяют в диметилсульфоксиде и разбавляют диметилсульфоксидом до 100 мл. К 1 мл полученного раствора прибавляют 12 мл диметилсульфоксида и разбавляют водой до 50 мл (раствор А). К 1 мл раствора А прибавляют 12 мл диметилсульфоксида и разбавляют водой до 50 мл.

Хроматографируют 50 мкл раствора сравнения и 50 мкл испытуемого раствора и определяют площадь пика примеси В. Площадь пика примеси В на хроматограмме испытуемого раствора должна быть не более площади пика примеси В на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,0002 %).

Потеря в массе при высушивании. Не более 0,25 % (ОФС «Потеря в

массе при высушивании», способ 1). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

Сульфатная зола. Не более 0,1 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

Тяжелые металлы. Не более 0,001 %. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Тяжёлые металлы» в зольном остатке, полученном после сжигания 1,0 г субстанции (ОФС «Сульфатная зола»).

Остаточные органические растворители. В соответствии с требованиями ОФС «Остаточные органические растворители».

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

Количественное определение. Около 0,25 г субстанции (точная навеска) растворяют в 50 мл уксусной кислоты ледяной и титруют 0,1 М раствором хлорной кислоты. Конечную точку титрования определяют потенциометрически.

Параллельно проводят контрольный опыт.

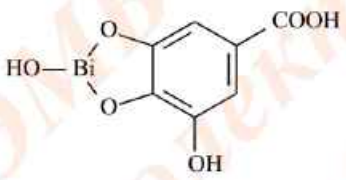
1 мл 0,1 М раствора хлорной кислоты соответствует 32,34 мг гликлазида $C_{15}H_{21}N_3O_3S$.

Хранение. В защищенном от света месте.

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

Висмута субгаллат	**ФС.2.1.0013.15**
Дерматол	**Взамен ГФ X, ст. 202;**
Bismuthi subgallas	**взамен ФС 42-2416-94**

2,7-Дигидрокси-1,3,2-бензодиоксабисмол-5-карбоновая кислота



$C_7H_5BiO_6$ М. м. 394,09

Содержит не менее 47,0 % и не более 51,0 % висмута Bi в пересчете на сухое вещество.

Описание. Аморфный порошок желтого цвета без запаха.

Растворимость. Легко растворим в 10 % растворе натрия гидроксида с образованием желтого раствора, быстро краснеющего на воздухе. Растворим с разложением при нагревании в азотной кислоте и 10 % растворе хлористоводородной кислоты, практически нерастворим в воде и спирте 96 %.

Подлинность. *1. Качественная реакция.* 0,1 г субстанции растворяют при кипячении в 3 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 % до получения прозрачного раствора. Раствор после охлаждения и прибавления 1 мл 2 % раствора натрия сульфида должен давать характерную реакцию А на

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

висмут (ОФС «Общие реакции на подлинность»).

2. Качественная реакция. Смесь, полученную после проведения реакции на висмут, фильтруют. К фильтрату прибавляют 10 мл воды и кипятят до удаления запаха сероводорода. После охлаждения доводят объем раствора водой до 10 мл и прибавляют 0,15 мл 3 % раствора железа(III) хлорида и 1 мл 10 % раствора аммиака; появляется фиолетово-черное окрашивание.

Кислотность. 1 г субстанции перемешивают с 20 мл воды в течение 1 мин и фильтруют. К фильтрату прибавляют 0,1 мл 0,05 % раствора метилового красного; полученная бледно-оранжевая окраска раствора должна перейти в желтую от прибавления не более 0,15 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида.

Потеря в массе при высушивании. Не более 7,0 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

Свинец, барий, кальций. Не более 0,02%. 1,5 г субстанции прокаливают в фарфоровом тигле при температуре 600 °С до постоянной массы, остаток охлаждают и растворяют в 5 мл азотной кислоты концентрированной, разбавляют водой до 15 мл и фильтруют. 5 мл полученного фильтрата не должны давать помутнения при прибавлении 3 мл 20 % раствора серной кислоты.

Серебро. Не более 0,002 %.

Эталонный раствор серебра-иона (0,01 мг/мл иона серебра). 1 мл 0,1 М раствора серебра нитрата помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 10 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

К 5 мл фильтрата, полученного при определении свинца, бария, кальция, прибавляют 1 мл азотной кислоты концентрированной и 0,5 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 %. Сравнивают опалесценцию

ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава России Электронный архив библиотеки

полученного раствора с эталоном, состоящим из 1 мл эталонного раствора серебра-иона, разведенного до 5 мл водой, и реактивов в таком количестве, которое прибавлено к испытуемому раствору.

Опалесценция испытуемого раствора не должна превышать опалесценцию эталона.

Медь. Не более 0,1 %.

Эталонный раствор меди-иона (0,1 мг/мл иона меди). 0,39 г меди(II) сульфата помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 10 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

К 5 мл фильтрата, полученного при определении свинца, бария, кальция, прибавляют 5 мл 10 % раствора аммиака и фильтруют. Сравнивают окраску полученного раствора с эталоном, состоящим из 5 мл эталонного раствора и такого же количества реактива, которое прибавлено к испытуемому раствору.

Окраска испытуемого раствора не должна превышать окраски эталона.

Нитраты. Не более 0,2 %. 0,5 г субстанции встряхивают в течение 1 мин с 15 мл серной кислоты разведенной 16 % и фильтруют. При осторожном прибавлении к фильтрату по стенке пробирки 3 мл раствора дифениламина на границе соприкосновения слоев не должно появиться синее кольцо.

Свободная галловая кислота. Не более 0,2%. 1 г субстанции встряхивают в течение 1 мин с 20 мл спирта 96 %, фильтруют во взвешенную чашку и выпаривают фильтрат на водяной бане досуха. Остаток высушивают при температуре 100 °С в течение 1 ч. Масса остатка не должна превышать 2 мг.

Мышьяк, теллур. 1 г субстанции прокаливают в фарфоровом тигле при температуре 600 °С до постоянной массы, охлаждают, смачивают 1 мл азотной кислоты, осторожно выпаривают и снова прокаливают до постоянной

Федеральный электронный медицинский библиотека

массы. Остаток растворяют в 5 мл хлористоводородной кислоты 25 % и далее испытание проводят в соответствии с ОФС «Мышьяк», метод 2, способ А. Не должно быть побурения (мышьяк) и почернения (теллур).

Хлориды. Не более 0,02 % (ОФС «Хлориды»). 0,5 г субстанции растворяют в 10 мл азотной кислоты разведенной 16 %, нагревают на водяной бане в течение 5 мин и фильтруют; 5 мл полученного фильтрата разбавляют водой до 15 мл. Для определения отбирают 10 мл полученного раствора.

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

Количественное определение. Около 0,3 г (точная навеска) субстанции помещают в фарфоровый тигель, прокаливают в муфельной печи при температуре 600 °С в течение 30 мин и охлаждают.

Остаток растворяют при нагревании в 5 мл азотной кислоты. Раствор количественно переносят в колбу вместимостью 500 мл, прибавляют 300 мл воды и титруют 0,05 М раствором натрия эдетата до перехода красной окраски в желтую (индикатор – 0,5 мл раствора ксиленолового оранжевого).

Параллельно проводят контрольный опыт.

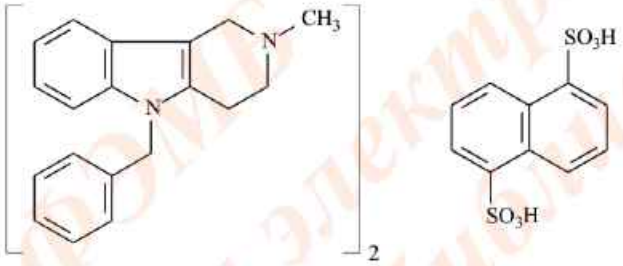
1 мл 0,05 М раствора натрия эдетата соответствует 10,45 мг висмута Bi.

Хранение. В плотно укупоренной упаковке, в защищенном от света месте.

Федеральный электронный медицинский библиотека ФЭМБ

Мебгидролина нападизилат	**ФС.2.1.0014.15**
Диазолин	**Взамен ФС 42-2054-96;**
Mebhydrolini napadisilas	**взамен ГФ XII, ч.1, ФС 42-0231-07**

5-Бензил-2-метил-2,3,4,5-тетрагидро-*1H*-пиридо [4,3-*b*]индола 1,5-нафталиндисульфонат (2:1)



$(C_{19}H_{20}N_2)_2 \cdot C_{10}H_8O_6S_2$ М. м. 841,0

Содержит не менее 99,0 % мебгидролина нападизилата $(C_{19}H_{20}N_2)_2 \cdot C_{10}H_8O_6S_2$ в пересчете на сухое вещество.

Описание. Белый или почти белый кристаллический порошок.

Растворимость. Практически нерастворим в воде, спирте 96 % и хлороформе.

Подлинность. *1. ИК-спектр.* Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области частот от 4000 до 400 $см^{-1}$ по положению полос поглощения должен соответствовать рисунку спектра мебгидролина (Приложение).

2. *УФ-спектр.* 0,1 г субстанции помещают в делительную воронку, прибавляют 10 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида, 20 мл эфира и

ФГБУ «Федеральная электронная медицинская библиотека»

встряхивают в течение 1 мин. Эфирное извлечение разбавляют спиртом 96 % до 100 мл и перемешивают. 2 мл полученного раствора разбавляют водой до 100 мл и перемешивают.

Ультрафиолетовый спектр поглощения полученного раствора субстанции в области длин волн от 240 до 350 нм должен иметь максимум поглощения при 280 нм.

3. Качественная реакция. 0,01 г субстанции растворяют в 2 мл серной кислоты концентриро-ванной и прибавляют 0,01 г натрия нитрита; через 2 мин должно появиться фиолетовое окрашивание.

4. Качественная реакция. 0,1 г субстанции сплавляют в тигле с 0,1 г натрия гидроксида в течение 15 мин. После охлаждения содержимое тигля растворяют при осторожном нагревании в 5 мл воды, прибавляют 5 мл 50 % раствора серной кислоты. Тигель накрывают фильтровальной бумагой, смоченной смесью 10 мл раствора калия дихромата и 0,1 мл серной кислоты концентрированной; в течение 5 мин должно появиться зеленое пятно.

Родственные примеси. Определение проводят методом тонкослойной хроматографии (ТСХ).

Испытуемый раствор. 0,1 г субстанции помещают в делительную воронку, прибавляют 2 мл 0,5 М раствора натрия гидроксида, 10 мл хлороформа и встряхивают в течение 1 мин. Хлороформный слой отделяют и фильтруют.

Раствор сравнения. 1 мл испытуемого раствора разбавляют хлороформом до 100 мл.

На линию старта пластинки со слоем силикагеля 60 F_{254} наносят 10 мкл (100 мкг) испытуемого раствора, 15 мкл (1,5 мкг), 10 мкл (1,0 мкг), 5 мкл (0,5 мкг) и 3 мкл (0,3 мкг) раствора сравнения. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру со свежеприготовленной смесью этилацетат – диэтиламин (50:1) и хроматографируют восходящим методом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат на воздухе до

удаления следов растворителей и просматривают в УФ свете при 254 нм.

Пятно любой примеси на хроматограмме испытуемого раствора по интенсивности поглощения и величине не должно превышать пятно на хроматограмме раствора сравнения (0,5 мкг) (не более 0,5 %). Суммарное содержание родственных примесей должно быть не более 1,5 %.

Результаты испытания считаются достоверными, если на хроматограмме раствора сравнения (0,3 мкг) четко видно пятно активной субстанции.

Хлориды. Не более 0,01 % (ОФС «Хлориды»). 0,4 г субстанции встряхивают со смесью 18 мл воды и 2 мл азотной кислоты разведенной 16 % в течение 1 мин и фильтруют. Для анализа отбирают 10 мл фильтрата.

Сульфаты. Не более 0,04 % (ОФС «Сульфаты»). 0,5 г субстанции встряхивают со смесью 18 мл воды и 2 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 % в течение 1 мин и фильтруют. Для анализа отбирают 10 мл фильтрата.

Потеря в массе при высушивании. Не более 0,5 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Для определения используют около 0,5 г (точная навеска) субстанции.

Сульфатная зола. Не более 0,1 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

Тяжелые металлы. Не более 0,001 %. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Тяжёлые металлы» в зольном остатке, полученном после сжигания 1,0 г субстанции (ОФС «Сульфатная зола»).

Остаточные органические растворители. В соответствии с требованиями ОФС «Остаточные органические растворители».

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

Количественное определение. Около 0,2 г (точная навеска) субстанции встряхивают в делительной воронке с 10 мл 0,5 М раствора натрия гидроксида в течение 1 мин. Прибавляют 10 мл хлороформа, встряхивают до полного растворения образовавшегося мебгидролина

основания и дают отстояться в течение 40 мин. Хлороформный слой сливают в коническую колбу, не допуская попадания водного слоя. Водный слой экстрагируют еще 2 раза порциями по 5 мл хлороформа, сливая хлороформный слой в ту же колбу. К объединенному хлороформному извлечению прибавляют 20 мл уксусной кислоты ледяной, 5 мл ангидрида уксусного и титруют 0,1 М раствором хлорной кислоты до появления зеленого окрашивания (индикатор – 0,3 мл 0,1 % раствора кристаллического фиолетового).

Параллельно проводят контрольный опыт.

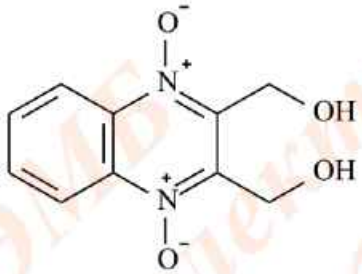
1 мл 0,1 М раствора хлорной кислоты соответствует 42,05 мг мебгидролина нападизилата $(C_{19}H_{20}N_2)_2 \cdot C_{10}H_8O_6S_2$.

Хранение. В защищенном от света месте.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Диоксидин	**ФС.2.1.0015.15**
Диоксидин	
Dioxydinum	**Взамен ФС 42-2308-97**

2,3-Ди(гидроксиметил)хиноксалин-1,4-диоксид



$C_{10}H_{10}N_2O_4$ М. м. 222,20

Содержит не менее 99,0 % диоксидина $C_{10}H_{10}N_2O_4$ в пересчете на сухое вещество.

Описание. Зеленовато-желтый кристаллический порошок. Под действием света разлагается.

Растворимость. Мало растворим в воде, мало и медленно растворим в спирте 96 % и хлороформе.

Подлинность

1. ИК-спектр. Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области частот от 4000 до 400 $см^{-1}$ по положению полос поглощения должен соответствовать рисунку спектра диоксидина (Приложение).

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

2. УФ-спектр. Ультрафиолетовый спектр поглощения свежеприготовленного 0,0005 % раствора субстанции в спирте 96 % в области длин волн от 220 до 280 нм должен иметь максимумы поглощения при 235 нм и 266 нм и минимум поглощения при 250 нм; в области от 340 до 400 нм должен иметь максимум поглощения при 382 нм.

3. Качественная реакция. К 0,02 г субстанции прибавляют 2 мл 1 М раствора натрия гидроксида и нагревают; должно появиться красное окрашивание.

Температура плавления. От 169 до 172 °С (ОФС «Температура плавления»). Скорость подъема температуры 2 °С/мин; субстанцию предварительно сушат при температуре 80 °С в течение 2 ч.

***Прозрачность раствора**. 0,1 г субстанции растворяют в 10 мл воды при нагревании до 30 °С и охлаждают. Раствор должен выдерживать сравнение с эталоном I (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

pH. От 5,8 до 7,0 (1 % раствор, ОФС «Ионометрия», метод 3).

Родственные примеси. Определение проводят методом тонкослойной хроматографии (ТСХ).

Испытуемый раствор. 0,01 г субстанции растворяют в 1 мл смеси метанол – вода (2:3).

Раствор сравнения А. 1 мл испытуемого раствора разбавляют смесью метанол – вода (2:3) до 100 мл.

Раствор сравнения Б. 0,01 г хиноксидина (2,3-ди[(ацетилокси)метил]хиноксалин-1,4-диоксида) растворяют в 100 мл хлороформа.

На линию старта пластинки со слоем силикагеля 60 F_{254} в токе холодного воздуха наносят 50 мкл (500 мкг) испытуемого раствора, 50 мкл (5 мкг) и 20 мкл (2 мкг) раствора сравнения *А*, 10 мкл (1 мкг) раствора сравнения *Б* и в общую точку 20 мкл (2 мкг) раствора сравнения *А* и 10 мкл (1 мкг) раствора сравнения *Б*. Пластинку с нанесенными пробами помещают

Республиканский ФЭМБ
Медицинская библиотека

в камеру со смесью растворителей хлороформ – спирт 96 % (19:1) и хроматографируют восходящим методом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат на воздухе в течение 10 мин и просматривают в УФ-свете при 254 нм.

Пятно примеси на хроматограмме испытуемого раствора, находящееся на уровне пятна хиноксидина, по величине и интенсивности поглощения не должно превышать пятно на хроматограмме раствора сравнения *Б* (не более 0,2 %). Суммарное содержание хиноксидина и других примесей, оцененное по величине и интенсивности поглощения их пятен на хроматограмме испытуемого раствора в сравнении с пятнами на хроматограммах раствора сравнения *А*, не должно превышать 1 %.

Результаты испытания считаются достоверными, если на хроматограмме общей точки нанесения раствора сравнения *А* (2 мкг) и раствора сравнения *Б* (1 мкг) наблюдаются 2 четких пятна.

Галогены. Не более 0,02 % (ОФС «Хлориды»). Определение проводят используя раствор, полученный в испытании «Прозрачность раствора».

Потеря в массе при высушивании. Не более 1,5 %. Около 0,5 г (точная навеска) субстанции сушат при температуре от 75 до 80 °С до постоянной массы.

Сульфатная зола. Не более 0,1% (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

Тяжелые металлы. Не более 0,001 %. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Тяжёлые металлы» в зольном остатке, полученном после сжигания 1,0 г субстанции (ОФС «Сульфатная зола»).

Остаточные органические растворители. В соответствии с требованиями ОФС «Остаточные органические растворители».

***Бактериальные эндотоксины.** Не более 0,5 ЕЭ на 1 мг субстанции (ОФС «Бактериальные эндотоксины»).

Для проведения испытания готовят исходный раствор субстанции

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

(концентрация 10 мг/мл) при нагревании до 37 °С, а затем разбавляют его не менее чем в 2 раза.

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

Количественное определение. Около 0,15 г (точная навеска) субстанции, растертой и предварительно высушенной при температуре от 75 до 80 °С до постоянной массы, помещают в коническую колбу вместимостью 50 мл, смешивают с 50 мл уксусного ангидрида и титруют 0,1 М раствором хлорной кислоты до появления чисто-желтого окрашивания (индикатор – 0,3 мл 0,1 % раствора кристаллического фиолетового) или потенциометрически.

По мере прибавления титранта субстанция растворяется.

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,1 М раствора хлорной кислоты соответствует 22,22 мг диоксидина $C_{10}H_{10}N_2O_4$.

Хранение. В защищенном от света месте.

*Контроль по показателям качества «Прозрачность раствора» и «Бактериальные эндотоксины» проводят в субстанциях, предназначенных для производства лекарственных препаратов для парентерального применения.

Федеральный электронный медицинский библиотека ФЭМБ

Дроперидол	**ФС.2.1.0016.15**
Дроперидол	**Взамен ФС 42-3185-95;**
Droperidolum	**взамен ГФ XII, ч.1, ФС 42-0234-07**

1-{1-[4-Оксо-4-(4-фторфенил)бутил]-1,2,3,6-тетрагидропиридин-4-ил}-1,3-дигидро-2*H*-бензимидазол-2-он



$C_{22}H_{22}FN_3O_2$ М. м. 379,43

Содержит не менее 99,0 % и не более дроперидола 101,0 % $C_{22}H_{22}FN_3O_2$ в пересчете на сухое и свободное от остаточных органических растворителей вещество.

Описание. От белого до желтовато-коричневого цвета аморфный или микрокристаллический порошок. На воздухе и на свету темнеет. Проявляет полиморфизм.

Растворимость. Растворим в хлороформе, мало растворим в спирте 96 %, практически нерастворим в воде.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Подлинность. *1. ИК-спектр.* Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области частот от 4000 до 400 $см^{-1}$ по положению полос поглощения должен соответствовать рисунку спектра дроперидола (Приложение).

2. УФ-спектр. 0,025 мг субстанции растворяют в 100 мл 0,0015 % раствора винной кислоты. 1 мл полученного раствора разбавляют 0,0015 % раствором винной кислоты до 10 мл. Ультрафиолетовый спектр полученного раствора в области длин волн от 230 до 300 нм должен иметь максимумы поглощения при 247 нм и 276 нм.

3. Качественная реакция. 0,5 мл 1 % раствора калия хромата в серной кислоте концентрированной нагревают в пробирке на водяной бане в течение 5 мин. Раствор легко смачивает стенки пробирки, не оставляя масляных капель. Прибавляют 0,01 г субстанции и снова нагревают в течение 5 мин; раствор не должен смачивать стенки пробирки, оставаясь в виде масляных капель.

Температура плавления. От 147 до 151 °С (ОФС «Температура плавления», метод 1, в интервале 3 °С). Субстанцию предварительно сушат в течение 4 ч при температуре 70 °С и остаточном давлении 20 мм рт. ст.

Прозрачность раствора. Раствор 0,2 г субстанции в 20 мл метиленхлорида должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

Цветность раствора. Окраска раствора, полученного в испытании «Прозрачность раствора», не должна превышать эталон BY_5 (ОФС «Степень окраски жидкостей»).

Родственные примеси. Определение проводят методом ВЭЖХ.

Испытуемый раствор. Около 0,1 г субстанции (точная навеска) помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в диметилформамиде и доводят объём до метки тем же растворителем.

Раствор сравнения. 1,0 мл испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем раствора диметилформамидом

до метки. 5,0 мл испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 20 мл и доводят объем раствора диметилформамидом до метки.

Раствор для проверки пригодности хроматографической системы. 0,0025 г субстанции и 0,0025 г стандартного образца бенперидола (1-[1-[4-оксо-4-(4-фторфенил)бутил]пиперидин-4-ил]-1,3-дигидро-2*H*-бензимидазол-2-он) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в диметилформамиде и доводят раствор до метки тем же растворителем.

Хроматографические условия

Колонка — 15 × 0,46 см с октадецилсилил силикагелем (C_{18}), 5 мкм;

Подвижная фаза (ПФ) — А: ацетонитрил
В: 1 % раствор тетрабутиламмония сульфата;

Градиентный режим

Время, мин	ПФ А, %	ПФ В, %
0 – 15	0⇒40	100⇒60
15 – 20	40	60
20 – 25	40⇒0	60⇒100

Скорость потока — 1,0 мл/мин;

Детектор — спектрофотометрический, 275 нм;

Объем пробы — 10 мкл.

Хроматографируют раствор для проверки пригодности хроматографической системы. Время удерживания пика дроперидола около 7 мин. Разрешение (*R*) между пиками дроперидола и бенперидола должно быть не менее 2,0.

Хроматографируют раствор сравнения и испытуемый раствор.

Площадь пика любой примеси на хроматограмме испытуемого раствора должна быть не более площади пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,25%); сумма площадей всех пиков примесей должна быть не более удвоенной площади пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,5%).

Не учитывают пики, площадь которых менее 0,2 площади основного пика на хроматограмме раствора сравнения.

Федеральный электронный медицинский библиотека

Хлориды. Не более 0,02 % (ОФС «Хлориды»). 1 г субстанции встряхивают в течение 5 мин с 19 мл воды и 1 мл азотной кислоты разведенной 16 % и фильтруют. Для анализа отбирают 2 мл фильтрата, разведенные водой до 10 мл.

Сульфаты. Не более 0,02 % (ОФС «Сульфаты»). Для анализа отбирают 10 мл фильтрата, полученного в испытании на «Хлориды».

Примечание. Разделы «Хлориды» и «Сульфаты» вводят при необходимости в зависимости от способа получения.

Потеря в массе при высушивании. Не более 0,5 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Для определения используют около 0,5 г (точная навеска) субстанции.

Сульфатная зола. Не более 0,1 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

Тяжелые металлы. Не более 0,001 %. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Тяжёлые металлы» в зольном остатке, полученном после сжигания 1,0 г субстанции (ОФС «Сульфатная зола»).

Остаточные органические растворители. В соответствии с требованиями ОФС «Остаточные органические растворители».

Бактериальные эндотоксины. Не более 8,3 ЕЭ на мг дроперидола (ОФС «Бактериальные эндотоксины»).

10 мг субстанции растворяют в 4 мл 0,15 % раствора винной кислоты для получения исходного раствора с концентрацией 2,5 мг/мл, а затем разводят в воде для ЛАЛ-теста не менее чем в 100 раз.

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

Количественное определение. Около 0,24 г (точная навеска) субстанции растворяют в 50 мл смеси уксусной кислоты ледяной и метилэтилкетона (1:7) и титруют 0,1 М раствором хлорной кислоты до зеленого окрашивания (индикатор – 0,2 мл 0,2 % раствора нафтолбензеина).

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,1 М раствора хлорной кислоты соответствует 37,94 мг дроперидола $C_{22}H_{22}FN_3O_2$.

Хранение. В плотно укупоренной упаковке, в защищенном от света месте.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Индапамид **ФС.2.1.0017.15**

Индапамид

Indapamidum **Взамен ФС 42-0303-08**

N-[(2*RS*)-2-Метил-2,3-дигидро-1*H*-индол-1-ил]-3-сульфамоил-4-хлорбензамид



$C_{16}H_{16}ClN_3O_3S$ М. м. 365,84

Содержит не менее 98,0 % и не более 102,0 % индапамида $C_{16}H_{16}ClN_3O_3S$ в пересчете на безводное и свободное от остаточных органических растворителей вещество.

Описание. Белый или почти белый кристаллический порошок.

Растворимость. Растворим в спирте 96 %, очень мало растворим в хлороформе, практически нерастворим в воде.

Подлинность

1. *ИК-спектр.* Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области частот от 4000 до 400 $см^{-1}$ по положению полос поглощения должен соответствовать спектру стандартного образца индапамида.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

2. *УФ-спектр.* Ультрафиолетовый спектр поглощения 0,001 % раствора субстанции в спирте 96 % в области длин волн от 220 до 350 нм должен иметь максимум поглощения и плечи при тех же длинах волн, что и спектр аналогичного раствора стандартного образца индапамида (соответственно при 242 нм, при 279 нм и 287 нм).

Угол вращения. От – 0,02 до + 0,02° (1 % раствор субстанции в спирте 96 %, ОФС «Поляриметрия»).

Родственные примеси. Определение проводят методом ВЭЖХ в условиях, описанных в разделе «Количественное определение».

Вводят в хроматограф по 10 мкл испытуемого и каждого из стандартных растворов. Время регистрации хроматограммы испытуемого раствора должно не менее чем в 2,5 раза превышать время удерживания основного пика. Чувствительность настраивают таким образом, чтобы высота основного пика на хроматограмме стандартного раствора В была не менее 15 % полной шкалы прибора.

На хроматограмме стандартного раствора D разрешение (*R*) между пиком индапамида и метилнитрозоиндолина должно быть не менее 4,0; на хроматограмме стандартного раствора В для пика индапамида отношение сигнал/шум должно быть не менее 6.

На хроматограмме испытуемого раствора площадь пика примеси *N*-(2-метил-1*H*-индол-1-ил)-3-сульфамоил-4-хлорбензамида не должна превышать площадь основного пика на хроматограмме стандартного раствора А (не более 0,3 %); площадь любого дополнительного пика не должна превышать площадь основного пика на хроматограмме стандартного раствора В (не более 0,1%); сумма площадей всех дополнительных пиков на хроматограмме испытуемого раствора не должна более чем в 5 раз превышать площадь основного пика на хроматограмме стандартного раствора В (не более 0,5%). Не учитывают пики, площадь которых составляет менее половины площади основного пика на хроматограмме стандартного раствора В (0,05 %).

Метилнитрозоиндолин. Определение проводят методом ВЭЖХ.

Растворы защищают от света и используют сразу же после приготовления или хранят при температуре 4 °С не более суток.

Буферный раствор pH 2,8. 1,5 г триэтиламина растворяют в 900 мл воды, прибавляют фосфорную кислоту концентрированную до pH 2,8 ± 0,1 и разбавляют водой до объёма 1000 мл.

Подвижная фаза. Ацетонитрил – тетрагидрофуран – буферный раствор pH 2,8 (7:20:73).

Раствор метилнитрозоиндолина. Около 1,25 мг (точная навеска) стандартного образца метилнитрозоиндолина [(2*RS*)-2-метил-1-нитрозо-2,3-дигидро-1*H*-индол] растворяют в ацетонитриле и разбавляют тем же растворителем до объёма 100,0 мл. 1,0 мл полученного раствора разбавляют ацетонитрилом до объёма 100 мл.

Раствор сравнения. 0,025 г субстанции растворяют в 1,0 мл *раствора метилнитрозоиндолина* и разбавляют водой до объёма 10 мл. Полученный раствор выдерживают в течение 1 ч при температуре 4 °С и фильтруют.

Испытуемый раствор. 0,025 г субстанции растворяют в 1,0 мл ацетонитрила и разбавляют водой до объёма 10,0 мл. Полученный раствор выдерживают в течение 1 ч при температуре 4 °С и фильтруют.

Хроматографические условия

Колонка	15 см × 0,46 см заполненная октадецилсиликагелем (C_{18}), размер частиц 5 мкм;
Скорость подвижной фазы	1,4 мл/мин;
Температура колонки	30 °С;
Детектор	спектрофотометрический, λ 305 нм;
Объем вводимой пробы	100 мкл.

Пригодность хроматографической системы. Хроматографируют раствор сравнения. Хроматографическая система считается пригодной, если коэффициент *p*/*v* (отношение высоты пика метилнитрозоиндолина к высоте

нижней точки кривой, соединяющей пик метилнитрозоиндолина с пиком индапамида) составляет не менее 6,7; отношение сигнал – шум для пика метилнитрозоиндолина не менее 3.

Допустимое содержание примесей. На хроматограмме испытуемого раствора площадь пика метилнитрозоиндолина должна быть не более разности площадей пиков метилнитрозоиндолина на хроматограммах раствора сравнения и испытуемого раствора (0,0005 %).

Вода. Не более 3,0 % (ОФС «Определение воды»). Около 0,1 г (точная навеска) субстанции растворяют в 10 мл смеси хлороформ – метанол (9:1) и титруют реактивом К. Фишера.

Сульфатная зола. Не более 0,1 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

Тяжелые металлы. Не более 0,001 %. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Тяжёлые металлы» в зольном остатке, полученном после сжигания 1,0 г субстанции (ОФС «Сульфатная зола»).

Остаточные органические растворители. В соответствии с требованиями ОФС «Остаточные органические растворители».

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

Количественное определение. Определение проводят методом ВЭЖХ. Растворы защищают от света и используют сразу же после приготовления или хранят при температуре 4 °С.

Раствор натрия эдетата. 0,2 г натрия эдетата растворяют в воде и доводят объем раствора водой до 1000 мл.

Подвижная фаза. Уксусная кислота ледяная – ацетонитрил – метанол – раствор натрия эдетата (0,1:17,5:17,5:65).

Испытуемый раствор. Около 0,05 г (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 17,5 мл смеси ацетонитрил – метанол (1:1), доводят объем раствором натрия эдетата до метки и перемешивают.

Стандартный раствор А. Около 30 мг (точная навеска) стандартного образца примеси *N*-(2-метилиндол-1-ил)-3-сульфамоил-4-хлорбензамида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 35 мл смеси ацетонитрил – метанол (1:1), доводят объем раствором натрия эдетата до метки и перемешивают. 1,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 35 мл смеси ацетонитрил – метанол (1:1), доводят объем раствором натрия эдетата до метки и перемешивают.

Стандартный раствор В. 1,0 мл испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора смесью ацетонитрил – метанол – раствор натрия эдетата (17,5:17,5:65) до метки и перемешивают. 5,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора смесью ацетонитрил – метанол – раствор натрия эдетата (17,5:17,5:65) до метки и перемешивают.

Стандартный раствор С. Около 0,05 г (точная навеска) стандартного образца индапамида помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 17,5 мл смеси ацетонитрил – метанол (1:1), доводят объем раствора раствором натрия эдетата до метки и перемешивают.

Стандартный раствор D. Около 0,025 г (точная навеска) стандартного образца индапамида и около 0,045 г (точная навеска) стандартного образца метилнитрозоиндолина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 17,5 мл смеси ацетонитрил – метанол (1:1), доводят объем раствора раствором натрия эдетата до метки и перемешивают.

Хроматографические условия

Колонка	20 см × 0,46 см заполненная октадецилсиликагелем (C_{18}), размер частиц 5 мкм;
Скорость подвижной фазы	2,0 мл/мин;
Температура колонки	40 °С;
Детектор	спектрофотометрический, λ 254 нм;
Объем вводимой пробы	10 мкл

Республиканская электронная медицинская библиотека

Колонку уравновешивают подвижной фазой до достижения стабильной базовой линии. Хроматографируют испытуемый раствор и стандартный раствор С, время удерживания основного пика индапамида должно быть около 10 мин.

Время регистрации хроматограммы должно не менее чем в 2 раза превышать время удерживания пика индапамида.

Относительное стандартное отклонение площади пика индапамида должно быть не более 2,0 %; фактор асимметрии пика индапамида должен быть не более 2,0; эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику индапамида, должна быть не менее 5000 теоретических тарелок.

Содержание индапамида $C_{16}H_{16}ClN_3O_3S$ в субстанции в пересчете на безводное, свободное от остаточных органических растворителей вещество в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где S – площадь пика индапамида на хроматограмме испытуемого раствора;

S_0 – площадь пика индапамида на хроматограмме стандартного раствора С;

a_0 – навеска стандартного образца индапамида, г;

a – навеска субстанции, г;

W – суммарное содержание воды и остаточных органических растворителей в субстанции, %;

P – содержание $C_{16}H_{16}ClN_3O_3S$ в стандартном образце, %.

Хранение. В хорошо укупоренной упаковке, в защищенном от света месте.

Федеральная электронная медицинская библиотека

Калия перманганат	**ФС.2.1.0018.15**
Калия перманганат	**Взамен ГФ X, ст. 363;**
Kalii permanganas	**взамен ФС 42-3007-99**

Перманганат калия

$KMnO_4$ М. м. 158,03

Содержит не менее 99,0 % калия перманганата $KMnO_4$.

Описание. Темно-фиолетовые или красно-фиолетовые кристаллы или мелкокристаллический порошок с металлическим блеском.

При взаимодействии калия перманганата с некоторыми органическими или легко окисляющимися веществами может произойти взрыв.

Растворимость. Растворим в воде, легко растворим в кипящей воде.

Подлинность. *1. Качественная реакция.* 0,02 г субстанции растворяют в 20 мл воды и перемешивают. К 5 мл полученного раствора прибавляют 1 мл серной кислоты разведенной 16 % и 1,5 мл раствора водорода пероксида разведенного; раствор должен обесцветиться.

2. Качественная реакция. 0,5 г субстанции растворяют в 20 мл воды, прибавляют 2 мл спирта 96 %, кипятят до полного обесцвечивания раствора и фильтруют. Объем фильтрата доводят водой до 25 мл и перемешивают. Полученный раствор дает характерную реакцию А на калий (ОФС «Общие реакции на подлинность»).

Вещества, нерастворимые в воде. 0,5 г субстанции растворяют в 50 мл воды, нагревают до кипения и фильтруют через стеклянный фильтр ПОР 16,

ФГБУ ЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

предварительно высушенный до постоянной массы и взвешенный. Осадок на фильтре промывают водой до получения бесцветного фильтрата. Фильтр с осадком высушивают при температуре от 100 до 105 °С до постоянной массы. Масса остатка не должна превышать 1,0 %.

Хлориды. Не более 0,02 % (ОФС «Хлориды»). 5 мл раствора, приготовленного в разделе «Подлинность» для испытания на калий, разводят водой до 10 мл и перемешивают.

Сульфаты. Не более 0,05 % (ОФС «Сульфаты», метод 1). Для определения используют раствор, приготовленный в разделе «Подлинность» для испытания на калий.

Количественное определение. Около 0,3 г субстанции (точная навеска) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 25,0 мл полученного раствора переносят в коническую колбу с притертой пробкой, содержащую 10 мл 20 % раствора калия йодида, и прибавляют 5 мл серной кислоты разведенной 16 %. Колбу закрывают пробкой, смоченной 20 % раствором калия йодида, и оставляют в темном месте на 10 мин, затем прибавляют 100 мл воды, обмывая пробку. Выделившийся йод титруют 0,1 М раствором натрия тиосульфата до обесцвечивания, используя в качестве индикатора 1– 2 мл раствора крахмала.

Параллельно проводят контрольный опыт.

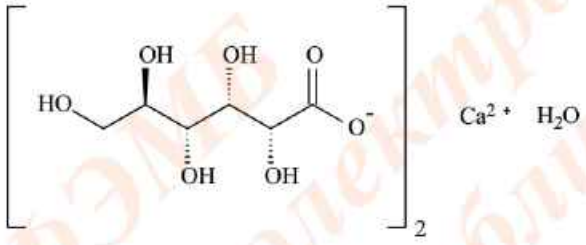
1 мл 0,1 М раствора натрия тиосульфата соответствует 3,161 мг калия пермангагата $KMnO_4$.

Хранение. В хорошо укупоренной упаковке.

Федеральная электронная медицинская библиотека

Кальция глюконат	**ФС.2.1.0019.15**
Кальция глюконат	**Взамен ФС 42-3019-94;**
Calcii gluconas	**взамен ГФ XII, ч.1, ФС 42-0238-07**

D-Глюконат кальция (2:1), моногидрат



$C_{12}H_{22}CaO_{14}\cdot H_2O$ М. м. 448,4

Содержит не менее 98,5 % и не более 102,0 % кальция глюконата $C_{12}H_{22}CaO_{14}\cdot H_2O$ для субстанции, предназначенной для производства нестерильных лекарственных препаратов.

Содержит не менее 99,0 % и не более 101,0 % кальция глюконата $C_{12}H_{22}CaO_{14}\cdot H_2O$ для субстанции, предназначенной для производства лекарственных препаратов для парентерального применения.

Описание. Белый или почти белый зернистый или кристаллический порошок без запаха.

Растворимость. Легко растворим в кипящей воде, умеренно (медленно) растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 %.

Подлинность. *1. ИК-спектр.* Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области частот от 4000 до 400 $см^{-1}$ по

ФЭМБ Фармакопейная электронная медицинская библиотека

положению полос поглощения должен соответствовать рисунку спектра кальция глюконата (Приложение).

2. Качественная реакция. 1 г субстанции растворяют в 50 мл воды, прибавляют 0,3 мл 3 % раствора железа(III) хлорида; должно появиться светло-зеленое окрашивание.

3. Качественная реакция. Субстанция дает характерные реакции на кальций (ОФС «Общие реакции на подлинность»).

***Цветность раствора.** 1 г субстанции растворяют в 50 мл воды при температуре 60 °С. Окраска полученного раствора не должна превышать эталон Y_6 (ОФС «Степень окраски жидкостей»).

В случае, если субстанция предназначена для приготовления лекарственных форм для парентерального применения, окраска полученного раствора не должна превышать эталон B_7.

***Прозрачность раствора**. Раствор, полученный в испытании на «Цветность раствора», охлаждают. Степень мутности полученного раствора не должна превышать эталон II (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

***pH**. От 6,0 до 7,2 (2 % раствор, ОФС «Ионометрия», метод 3).

Посторонние органические примеси и борная кислота. 0,5 г субстанции смешивают с 2 мл охлаждённой серной кислоты концентрированной в фарфоровой чашке, которая предварительно ополоснута тем же растворителем, и помещают на лед. Не должно появляться желтого или коричневого окрашивания раствора. Затем прибавляют 1 мл 0,005 % раствора хромотропа II B и перемешивают. Должно появиться фиолетовое окрашивание, которое не переходит со временем в темно-голубое. Окраска полученного раствора не должна превышать окраску смеси 1 мл 0,005 % раствора хромотропа II B и 2 мл охлаждённой серной кислоты концентрированной.

Декстрин, **сахароза**. 0,5 г субстанции растворяют при нагревании в смеси 2 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 % и 10 мл воды. К

охлажденному раствору постепенно прибавляют 8 мл 10,6 % раствора натрия карбоната и через 5 мин фильтруют. К 5 мл фильтрата прибавляют 1 мл медно-тартратного реактива и кипятят на водяной бане; не должен образовываться красный осадок.

Галогены. Не более 0,005 %.

Испытуемый раствор 1. 0,5 г субстанции растворяют при нагревании в 25 мл воды и охлаждают.

Эталонный раствор 1. 1,03 г предварительно высушенного при 110 ºС натрия бромида помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, растворяют в воде и доводят объем раствора водой до метки. 5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 1 л и доводят объем раствора водой до метки. 1 мл эталонного раствора 1 содержит 0,004 мг бромид-иона.

К 10 мл испытуемого раствора 1 и эталонного раствора 1 прибавляют по 0,5 мл азотной кислоты, 0,5 мл 2 % раствора серебра нитрата, перемешивают и выдерживают в течение 5 мин.

Опалесценция испытуемого раствора 1 не должна превышать опалесценцию эталонного раствора 1 (не более 0,02 %).

В случае, если субстанция предназначена для приготовления лекарственных форм для парентерального применения, в методику вносят следующие изменения:

Испытуемый раствор 2. 1 г субстанции растворяют при нагревании в 25 мл воды и охлаждают.

Эталонный раствор 2. 5 мл эталонного раствора 1 разбавляют водой до 10 мл.

К 10 мл испытуемого раствора 2 и эталонного раствора 2 прибавляют по 0,5 мл азотной кислоты, 0,5 мл 2 % раствора серебра нитрата, перемешивают и выдерживают в течение 5 мин.

Опалесценция испытуемого раствора 2 не должна превышать опалесценцию эталонного раствора 2.

***Сульфаты**. Не более 0,005 % (ОФС «Сульфаты»). 1 г субстанции растворяют при нагревании в 25 мл воды и охлаждают. Для анализа отбирают 10 мл полученного раствора.

Магний и щелочные металлы. Не более 0,4 %. В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 1 г субстанции, растворяют в 100 мл кипящей воды, прибавляют 10 мл 0,3 % раствора аммония хлорида, 1 мл 10 М раствора аммиака и по каплям 50 мл нагретого до 60 °С 2,5 % раствора аммония оксалата и выдерживают в течение 4 ч. Полученный раствор разбавляют водой до 200 мл и фильтруют. Выпаривают 100 мл фильтрата досуха и прокаливают сухой остаток при 500 °С. После прокаливания масса остатка не должна превышать 2 мг.

***Оксалаты.** Не более 0,01 %.

Определение проводят методом ионообменной ВЭЖХ.

Подвижная фаза (ПФ). 0,212 г натрия карбоната безводного и 63 мг натрия гидрокарбоната помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в воде для хроматографии, доводят объём раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Регенерирующий раствор. 1,23 г серной кислоты концентрированной прибавляют к 200 мл воды для хроматографии, доводят объём раствора тем же растворителем до 1000 мл и перемешивают.

Испытуемый раствор. Около 1,0 г (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде для хроматографии, доводят объём раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Раствор натрия оксалата. 0,0152 г натрия оксалата помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде для хроматографии, доводят объём раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Раствор сравнения. Около 1,0 г (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде для

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

хроматографии, прибавляют 0,5 мл раствора натрия оксалата, доводят объём раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Хроматографические условия

Предколонка	30 × 4 мм с подходящей сильной анионообменной смолой, 30 – 50 мкм;
Колонки 1 и 2	25 × 0,4 см с подходящей сильной анионообменной смолой, 30 – 50 мкм;
Анионоподавительная колонка	соединена последовательно с предколонкой и аналитическими колонками и снабжена микромембраной, отделяющей подвижную фазу от регенерирующего раствора, текущего в противоположном направлении;
Скорость потока ПФ	2 мл/мин;
Скорость потока регенерирующего раствора	4 мл/мин;
Детектор	кондуктометрический;
Объём пробы	50 мкл.

Хроматографическая система считается пригодной, если относительное стандартное отклонение площади пика оксалата не более 2,0 % при 5 последовательных введениях; фактор асимметрии не более 1,2.

Хроматографируют испытуемый раствор и раствор сравнения. Содержание оксалатов в субстанции в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \cdot 50}{S_0 - S}$$

где S – площадь пика оксалата на хроматограмме испытуемого раствора;

S_0 - площадь пика оксалата на хроматограмме раствора сравнения.

***Фосфаты.** Не более 0,01 % (ОФС «Фосфаты»). 1 мл раствора, полученного в испытании «Цветность раствора», разводят водой до 100 мл.

***Железо.** Не более 0,0005 %. Определение проводят методом атомно-абсорбционной спектрометрии.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Испытуемый раствор. 2,0 г субстанции помещают в тефлоновый стакан вместимостью 100 мл и прибавляют 5 мл азотной кислоты концентрированной. Кипятят, упаривая почти досуха. Прибавляют 1 мл 30 % водорода пероксида и снова упаривают почти досуха. Повторяют обработку пероксидом водорода до тех пор, пока не получится прозрачный раствор. При помощи 2 мл азотной кислоты концентрированной переносят полученный раствор в мерную колбу вместимостью 25 мл. Доводят объём раствора кислотой хлористоводородной разведённой 7,3 % до метки и перемешивают.

Компенсационный раствор готовят таким же образом, используя вместо субстанции 0,65 г кальция хлорида, предварительно проверенного на содержание железа (не более 0,0005 %).

Растворы сравнения. Растворы сравнения с концентрациями ионов железа 0,4 мкг/мл, 1,0 мкг/мл, 2,0 мкг/мл готовят соответствующими разведениями стандартного раствора 20 мкг/мл железо(III)-иона хлористоводородной кислотой разведённой 7,3 %.

Интенсивность излучения измеряют при длине волны 248,3 нм, используя лампу с полым катодом на железо в качестве источника излучения и воздушно-ацетиленовое пламя. Проводят основную коррекцию, используя дейтериевую лампу.

Тяжелые металлы. Не более 0,002 % (ОФС «Тяжёлые металлы»). 0,5 г субстанции растворяют при нагревании в смеси 2 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 % и 8 мл воды и охлаждают.

Мышьяк. Не более 0,0002 % (ОФС «Мышьяк»). Для определения используют 0,25 г субстанции.

Потеря в массе при высушивании. Не более 1,0 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Для определения используют около 0,5 г (точная навеска) субстанции.

***Бактериальные эндотоксины.** Не более 0,17 ЕЭ на 1 мг субстанции (ОФС «Бактериальные эндотоксины»).

Федеральной электронной медицинской библиотеки ФЭМБ

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

Количественное определение. Около 0,4 г (точная навеска) субстанции растворяют при нагревании в 20 мл воды. После охлаждения прибавляют 10 мл аммиачного буферного раствора и титруют 0,05 М раствором натрия эдетата до появления сине-фиолетового окрашивания (индикатор – 0,5 мл раствора кислотного хромового темно-синего).

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,05 М раствора натрия эдетата соответствует 22,42 мг кальция глюконата $C_{12}H_{22}CaO_{14}\cdot H_2O$.

Хранение. В хорошо укупоренной упаковке, в защищенном от света месте.

*Контроль по показателям качества «Цветность», «Прозрачность», «pH», «Оксалаты», «Сульфаты», «Фосфаты», «Железо», «Бактериальные эндотоксины» проводят в субстанции, предназначенной для производства лекарственных препаратов для парентерального применения.

ФГБУ Федеральная электронная медицинская библиотека

Карбамазепин	**ФС.2.1.0020.15**
Карбамазепин	**Взамен ФС 42-2803-96;**
Carbamazepinum	**взамен ГФ XII, ч.1, ФС 42-0240-07**

5*H*-Дибенз[*b*,*f*]азепин-5-карбоксамид



$C_{15}H_{12}N_2O$ М. м. 236,27

Содержит не менее 98,0 % и не более 102,0 % карбамазепина $C_{15}H_{12}N_2O$ в пересчете на сухое вещество.

Описание. Белый или почти белый кристаллический порошок.

Растворимость. Легко растворим в хлороформе, умеренно растворим в спирте 96 %, очень мало или практически нерастворим в воде.

Подлинность. *1. ИК-спектр.* Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области частот от 4000 до 400 $см^{-1}$ по положению полос поглощения должен соответствовать спектру стандартного образца карбамазепина.

2. УФ-спектр. Ультрафиолетовый спектр поглощения 0,001 % раствора субстанции в спирте 96 % в области длин волн от 220 до 350 нм должен иметь максимумы поглощения при 237 и 285 нм и минимумы

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

поглощения при 233 и 258 нм.

Температура плавления. От 189 до 193 °С (ОФС «Температура плавления»).

Кислотность или щелочность. К 1,0 г субстанции прибавляют 20 мл воды, свободной от углерода диоксида, перемешивают в течение 15 мин и фильтруют. К 10 мл фильтрата прибавляют 0,05 мл 1 % раствора фенолфталеина и 0,5 мл 0,01 М раствора натрия гидроксида, раствор окрашивается в красный цвет. Прибавляют 1,0 мл 0,01 М раствора хлористоводородной кислоты; раствор бесцветный. Прибавляют 0,15 мл 0,05 % раствора метилового красного; раствор окрашивается в красный цвет.

Родственные примеси. Определение проводят методом ВЭЖХ.

Подвижная фаза. К 1000 мл смеси вода – метанол – тетрагидрофуран (85:12:3) прибавляют 0,2 мл муравьиной кислоты 99,7 %, перемешивают, прибавляют 0,5 мл триэтиламина и перемешивают.

Испытуемый раствор. Около 0,1 г (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в метаноле, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают. 25,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 20 мл воды, перемешивают, по охлаждении доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Раствор сравнения. Около 0,01 г (точная навеска) стандартного образца 10,11-дигидрокарбамазепина (10,11-дигидро-5*H*-дибенз[*b*,*f*]азепин-5-карбоксамид), около 0,01 г (точная навеска) стандартного образца иминостильбена (5*H*-дибенз[*b*,*f*]азепин) и около 0,01 г (точная навеска) стандартного образца карбамазепина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в метаноле, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают. 1,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора смесью вода – метанол (1:1) до метки и перемешивают.

Хроматографические условия

Колонка	25 × 0,46 см с нитрил силикагелем (CN), 10 мкм;
Скорость потока	1,5 мл/мин;
Детектор	спектрофотометрический, 230 нм;
Объем пробы	20 мкл.

Хроматографируют раствор сравнения. Относительные времена удерживания компонентов: 10,11-дигидрокарбамазепин – около 0,9; карбамазепин – 1,0; иминостильбен – около 5,1. Разрешение (*R*) между пиками 10,11-дигидрокарбамазепина и карбамазепина должно быть не менее 1,7.

Хроматографируют раствор сравнения и испытуемый раствор. Время регистрации хроматограммы испытуемого раствора должно не менее чем в 6 раз превышать время удерживания пика карбамазепина.

Содержание примесей 10,11-дигидрокарбамазепина и иминостильбена в субстанции в процентах (*X*) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot a_0 \cdot 2}{S_0 \cdot a_1},$$

где S_1 – площадь пика 10,11-дигидрокарбамазепина (или иминостильбена) на хроматограмме испытуемого раствора;

S_0 – площадь пика 10,11-дигидрокарбамазепина (или иминостильбена) на хроматограмме раствора сравнения;

a_1 – навеска субстанции, г;

a_0 – навеска 10,11-дигидрокарбамазепина (или иминостильбена), г.

Содержание любой неидентифицированной примеси в субстанции в процентах (*X*) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot a_0 \cdot 2}{S_0 \cdot a_1},$$

где S_1 – площадь пика неидентифицированной примеси на хроматограмме испытуемого раствора;

S_0 – площадь пика карбамазепина на хроматограмме раствора сравнения;

a_1 – навеска субстанции, г;

a_0 – навеска стандартного образца карбамазепина, г.

Содержание любой примеси должно быть не более 0,2 %, суммарное содержание примесей – не более 0,5 %.

Потеря в массе при высушивании. Не более 0,5 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Для определения используют около 0,5 г (точная навеска) субстанции.

Хлориды. Не более 0,02 %.

Испытуемый раствор. 0,05 г субстанции растворяют в 1 мл диметилсульфоксида, прибавляют 4 мл спирта 96 %, 5 мл воды, 0,5 мл азотной кислоты и 0,5 мл 2 % раствора серебра нитрата, перемешивают и выдерживают 15 мин.

Эталонный раствор. Смешивают 1 мл диметилсульфоксида, 4 мл спирта 96 %, 5 мл стандартного раствора хлорид-иона (2 мкг/мл), 0,5 мл азотной кислоты, 0,5 мл 2 % раствора серебра нитрата и выдерживают 15 мин.

Опалесценция испытуемого раствора не должна превышать опалесценцию эталонного раствора.

Сульфатная зола. Не более 0,1 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

Тяжелые металлы. Не более 0,001 %. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Тяжёлые металлы» в зольном остатке, полученном после сжигания 1,0 г субстанции (ОФС «Сульфатная зола»).

Остаточные органические растворители. В соответствии с требованиями ОФС «Остаточные органические растворители».

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

Количественное определение. Определение проводят методом ВЭЖХ в условиях, описанных в разделе «Родственные примеси».

Испытуемый раствор. Около 0,05 г (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в метаноле, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают. 5 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора смесью метанол – вода (1:1) до метки и перемешивают.

Раствор стандартного образца. Около 0,05 г (точная навеска) стандартного образца карбамазепина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в метаноле, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают. 5,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора смесью метанол – вода (1:1) до метки и перемешивают.

5 раз хроматографируют раствор стандартного образца. Относительное стандартное отклонение площади пика карбамазепина должно быть не более 2,0 %.

Хроматографируют испытуемый раствор и раствор стандартного образца.

Содержание $C_{15}H_{12}N_2O$ в субстанции в процентах (X) в пересчете на сухое вещество вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot a_0 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot a_1 \cdot (100 - W)},$$

где S_1 – площадь пика карбамазепина на хроматограмме испытуемого раствора;

S_0 – площадь пика карбамазепина на хроматограмме раствора стандартного образца;

a_1 – навеска субстанции, г;

a_0 – навеска стандартного образца карбамазепина, г;

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

W - потеря в массе при высушивании субстанции, %;

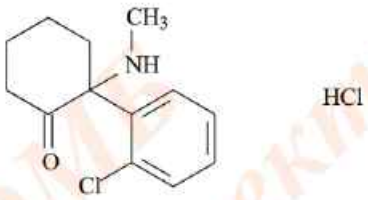
P - содержание $C_{15}H_{12}N_2O$ в стандартном образце карбамазепина, %.

Хранение. В плотно укупоренной упаковке.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Кетамина гидрохлорид	**ФС.2.1.0021.15**
Кетамина гидрохлорид	**Взамен ФС 42-2849-92;**
Ketamini hydrochloridum	**взамен ГФ XII, ч.1, ФС 42-0241-07**

(2*RS*)-2-(Метиламино)-2-(2-хлорфенил)циклогексанона гидрохлорид



$C_{13}H_{16}ClNO \cdot HCl$ М. м. 274,19

Содержит не менее 98,5 % и не более 101,0 % кетамина гидрохлорида $C_{13}H_{16}ClNO \cdot HCl$.

Описание. Белый кристаллический порошок.

Растворимость. Легко растворим в воде и метаноле, растворим в спирте 96 %, умеренно растворим в хлороформе.

Подлинность. *1. ИК-спектр.* Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области частот от 4000 до 400 $см^{-1}$ по положению полос поглощения должен соответствовать спектру стандартного образца кетамина. Образец предварительно не сушат.

2. УФ-спектр. Ультрафиолетовый спектр поглощения 0,03 % раствора субстанции в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты в области длин волн от 250 до 320 нм должен иметь максимумы поглощения при 270 нм и

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

276 нм, минимум поглощения при 274 нм и плечо в интервале от 260 до 266 нм.

3. УФ-спектр. Ультрафиолетовый спектр поглощения 0,08 % раствора субстанции в смеси 0,1 М раствор натрия гидроксида – вода – метанол (1:4:95) в области длин волн от 250 до 350 нм должен иметь максимумы поглощения при 263 нм, 269 нм, 277 нм и 302 нм и минимум поглощения при 282 нм.

4. Качественная реакция. Субстанция должна давать характерную реакцию на хлориды (ОФС «Общие реакции на подлинность»).

Угол вращения. От – 0,2º до +0,2º (2 % раствор субстанции в воде, свободной от диоксида углерода, ОФС «Поляриметрия»).

Температура плавления. От 258 до 262 ºС (с разложением, метод 1, без предварительного подсушивания, ОФС «Температура плавления»).

Прозрачность раствора. Раствор 2 г субстанции в 10 мл воды должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей.

Цветность раствора. Раствор, полученный в испытании на «Прозрачность раствора», должен быть бесцветным.

pH. От 3,5 до 4,1 (10 % раствор, ОФС «Ионометрия», метод 3).

Родственные примеси. Определение проводят методом ВЭЖХ.

Подвижная фаза (ПФ). 0,95 г натрия гексансульфоната растворяют в 1000 мл смеси ацетонитрил – вода (25:75), прибавляют 4 мл уксусной кислоты ледяной и перемешивают.

Испытуемый раствор. 0,05 г субстанции растворяют в 50 мл ПФ.

Раствор сравнения. 1,0 мл испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 200 мл, доводят объем раствора ПФ до метки и перемешивают.

Раствор для проверки пригодности хроматографической системы. 0,005 г стандартного образца примеси А кетамина (1-[(метилимино)(2-хлорфенил)метил]циклопентанол) растворяют в 5 мл ПФ. 0,5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют

0,5 мл испытуемого раствора и доводят ПФ до метки. Раствор готовят непосредственно перед использованием.

Хроматографические условия

Колонка	12,5 × 0,40 см с октадецилсилил силикагелем (C_{18}), 5 мкм;
Скорость потока	1,0 мл/мин;
Детектор	спектрофотометрический, 215 нм;
Объем пробы	20 мкл.

Хроматографируют раствор для проверки пригодности хроматографической системы. Время удерживания пика кетамина должно быть 3 – 4,5 мин; порядок элюирования компонентов: примесь А кетамина, кетамин. Разрешение (*R*) между пиками должно быть не менее 1,5; фактор асимметрии (*T*) пика кетамина должен быть не более 1,5.

Хроматографируют раствор сравнения и испытуемый раствор. Время регистрации хроматограммы испытуемого раствора должно не менее чем в 10 раз превышать время удерживания основного пика.

Сумма площадей всех пиков родственных примесей на хроматограмме испытуемого раствора должна быть не более площади пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,5 %). Не учитывают пики, площадь которых составляет менее 0,2 от площади пика на хроматограмме раствора сравнения (0,1 %).

Сульфатная зола. Не более 0,1 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют около 0,5 г (точная навеска) субстанции.

Тяжелые металлы. Не более 0,002 %. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Тяжёлые металлы» в зольном остатке, полученном после сжигания 0,5 г субстанции (ОФС «Сульфатная зола»).

Остаточные органические растворители. В соответствии с требованиями ОФС «Остаточные органические растворители».

Бактериальные эндотоксины. Не более 0,4 ЕЭ на 1 мг кетамина гидрохлорида (ОФС «Бактериальные эндотоксины»).

Для проведения испытания готовят исходный раствор субстанции 50 мг/мл, а затем разводят его не менее чем в 200 раз.

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

Количественное определение. Около 0,2 г (точная навеска) субстанции растворяют в 1 мл муравьиной кислоты, прибавляют 20 мл уксусной кислоты ледяной, 5 мл раствора ртути(II) ацетата и титруют 0,1 М раствором хлорной кислоты до появления сине-зеленого окрашивания (индикатор – 0,1 мл 0,1 % раствора кристаллического фиолетового).

Параллельно проводят контрольный опыт.

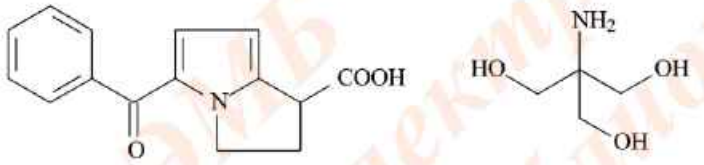
1 мл 0,1 М раствора хлорной кислоты соответствует 27,42 мг кетамина гидрохлорида $C_{13}H_{16}ClNO \cdot HCl$.

Хранение. В хорошо укупоренной упаковке, в защищенном от света месте.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Кеторолака трометамол	**ФС.2.1.0022.15**
Кеторолака трометамол	
Ketorolacum trometamolum	**Взамен ГФ XII, ч.1, ФС 42-0242-07**

(1*RS*)-5-Бензоил-2,3-дигидро-1*H*-пирролизин-1-карбоксилат 2-амино-2-(гидроксиметил)-1,3-пропандиола



$C_{15}H_{13}NO_3 \cdot C_4H_{11}NO_3$ М. м. 376,40

Содержит не менее 98,5 % и не более 101,5 % кеторолака трометамола $C_{15}H_{13}NO_3 \cdot C_4H_{11}NO_3$ в пересчете на сухое вещество.

Описание. Белый или почти белый кристаллический порошок.

Растворимость. Легко растворим в воде и метаноле, мало растворим спирте 96 %, практически нерастворим в метиленхлориде.

Подлинность. *1. ИК-спектр.* Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области частот от 4000 до 400 $см^{-1}$ по положению полос поглощения должен соответствовать спектру стандартного образца кеторолака трометамина.

2. УФ-спектр. Ультрафиолетовый спектр поглощения 0,001 % раствора субстанции в метаноле в области длин волн от 210 до 350 нм должен иметь максимумы поглощения при 245 нм и 312 нм.

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

3. Тонкослойная хроматография

Пластинка. Силикагеля GF_{254}.

Подвижная фаза. Метиленхлорид – ацетон – уксусная кислота ледяная 95:5:2 (о/о/о).

Испытуемый раствор. 0,01 г субстанции растворяют в 2 мл смеси метиленхлорид – метанол (2:1).

Стандартный раствор. 0,01 г стандартного образца кеторолака трометамина растворяют в 2 мл смеси метиленхлорид – метанол (2:1).

На линию старта ТСХ пластинки наносят по 40 мкл (200 мкг) испытуемого и стандартного растворов. Пластинку с нанесёнными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру с ПФ и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт подвижной фазы пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и опрыскивают 3 % раствором нингидрина в спирте 96 % и выдерживают при температуре 150 ºС в течение 2 – 5 мин.

На хроматограммах в точках нанесения испытуемого и стандартного растворов должны наблюдаться розовые или фиолетовые пятна с желтой каймой (трометамин).

***Прозрачность раствора**. Раствор 0,75 г субстанции в 25 мл воды должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

***Оптическая плотность раствора.** Оптическая плотность раствора, полученного в испытании «Прозрачность раствора», измеренная при длине волны 430 нм, должна быть не более 0,10.

pH. От 5,7 до 6,7 (1 % раствор, ОФС «Ионометрия», метод 3).

Родственные примеси. Определение проводят методом ВЭЖХ, используя хроматограмму испытуемого раствора, полученную в разделе «Количественное определение». Примеси «1-кетоаналога» (5-Бензоил-2,3-дигидро-1*H*-пирролизин-1-он) и «1-гидроксианалога» ((1*RS*)-5-Бензоил-2,3-

дигидро-1*H*-пирролизин-1-ол) идентифицируют по хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы.

Содержание любой примеси в субстанции в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{k_i \cdot S_i \cdot 100}{\Sigma(k_i \cdot S_i) + S}$$

где S_i – площадь пика примеси;

k_i – поправочный коэффициент для площади пика примеси (k_i = 0,52 для «1-кетоаналога», k_i = 0,67 для «1-гидроксианалога», k_i = 2,2 для примеси с относительным к кеторолаку временем удерживания 0,54, k_i = 0,91 для примеси с относительным временем удерживания 0,66);

S – площадь пика кеторолака.

Содержание примеси «1-кетоаналога» должно быть не более 0,1 %, примеси «1-гидроксианалога» – не более 0,1 %, любой другой единичной примеси – не более 0,5 %. Суммарное содержание примесей должно быть не более 1,0 %.

Потеря в массе при высушивании. Не более 0,5 %. Около 1 г (точная навеска) субстанции сушат в вакууме при температуре 60 °С до постоянной массы.

Сульфатная зола. Не более 0,1 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют около 0,5 г (точная навеска) субстанции.

Тяжелые металлы. Не более 0,002 %. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Тяжёлые металлы» в зольном остатке, полученном после сжигания 0,5 г субстанции (ОФС «Сульфатная зола).

Остаточные органические растворители. В соответствии с требованиями ОФС «Остаточные органические растворители».

***Бактериальные эндотоксины.** Не более 5,8 ЕЭ на 1 мг кеторолака трометамина (ОФС «Бактериальные эндотоксины»).

Для проведения испытания готовят исходный раствор субстанции (концентрация 30 мг/мл), а затем разводят его не менее чем в 500 раз.

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

Количественное определение. Определение проводят методом ВЭЖХ.

Фосфатный буферный раствор pH 3,0. 5,75 г аммония фосфата однозамещенного помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в 900 мл воды, доводят pH полученного раствора ортофосфорной кислотой до 3,0 ± 0,1, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают.

Испытуемый раствор. Около 0,05 г (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, растворяют в смеси вода – тетрагидрофуран (7:3), доводят объем раствора той же смесью до метки и перемешивают. Раствор защищают от действия света.

Стандартный раствор. Около 0,05 г (точная навеска) стандартного образца кеторолака трометамина помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, растворяют в смеси вода – тетрагидрофуран (7 : 3), доводят объем раствора той же смесью до метки и перемешивают. Раствор защищают от действия света.

Раствор для проверки пригодности хроматографической системы. В делительную воронку вместимостью 250 мл помещают 100 мл воды, прибавляют 100 мл метиленхлорида, 30 мг стандартного образца кеторолака трометамина и 1 мл 1 М раствора хлористоводородной кислоты, встряхивают и оставляют стоять до разделения слоев. Отделяют нижний органический слой и выдерживают на прямом солнечном свету в течение 10 – 15 мин. 1 мл полученного раствора высушивают досуха в токе воздуха или азота, сухой остаток растворяют в 1 мл смеси вода – тетрагидрофуран (7: 3). Полученный раствор содержит кеторолак и продукты его разложения: «1-кетоаналог» и «1-гидроксианалог».

Хроматографические условия

Колонка	25 × 0,46 см с октилсилилсиликагелем (C_8), 5 мкм;
Подвижная фаза	фосфатный буферный раствор с pH 3,0 – тетрагидрофуран (70:30);
Скорость потока	1,5 мл/мин;
Температура	40 °С;
Детектор	спектрофотометрический, 313 нм;
Объем пробы	10 мкл.

Хроматографируют раствор для проверки пригодности хроматографической системы. Время удерживания пика кеторолака должно быть в пределах 8 – 12 мин. Относительные времена удерживания компонентов: «1-гидроксианалог» – около 0,63; «1-кетоаналог» – около 0,89; кеторолак – 1,00. Разрешение (R) между пиками «1-гидроксианалога» и «1-кетоаналога» должно быть не менее 1,5.

Хроматографируют стандартный раствор. Относительное стандартное отклонение площади пика кеторолака должно быть не более 1,5 %.

Хроматографируют испытуемый и стандартный растворы. Время регистрации хроматограммы испытуемого раствора должно не менее чем в 3 раза превышать время удерживания основного пика.

Содержание кеторолака трометамола $C_{15}H_{13}NO_3 \cdot C_4H_{11}NO_3$ в субстанции в процентах (X) в пересчете на сухое вещество вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot a_0 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot a_1 \cdot (100 - W)},$$

где S_1 – площадь пика кеторолака на хроматограмме испытуемого раствора;

S_0 – площадь пика кеторолака на хроматограмме стандартного раствора;

a_1 – навеска субстанции, г;

a_0 – навеска стандартного образца кеторолака трометамина, г;

W – потеря в массе при высушивании субстанции, %;

Федеральный электронный медицинский библиотека

P – содержание $C_{15}H_{13}NO_3 \cdot C_4H_{11}NO_3$ в стандартном образце кеторолака трометамина, %.

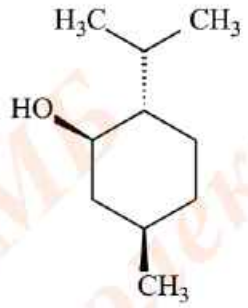
Хранение. В защищенном от света месте.

*Контроль по показателям качества «Прозрачность раствора», «Оптическая плотность раствора», «Бактериальные эндотоксины» проводят в субстанциях, предназначенных для производства лекарственных препаратов для парентерального применения.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Левоментол	**ФС.2.1.0023.15**
Левоментол	
Levomentholum	**Взамен ГФ X, ст. 387**

(1*R*,2*S*,5*R*)-5-Метил-2-(пропан-2-ил)циклогексанол



$C_{10}H_{20}O$ М. м. 156,27

Содержит не менее 99,0 % левоментола $C_{10}H_{20}O$.

Описание. Бесцветные кристаллы или кристаллический порошок с сильным запахом мяты перечной.

Растворимость. Очень легко растворим в спирте 96 %, эфире, уксусной кислоте, легко растворим в жидком парафине и жирных маслах, очень мало растворим в воде

Подлинность. *1. ИК-спектр.* Инфракрасный спектр образца субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области частот от 4000 до 400 $см^{-1}$ по положению полос поглощения должен соответствовать рисунку спектра левоментола (Приложение).

2. Качественная реакция. 0,01 г субстанции растворяют в 1 мл серной кислоты концентрированной и прибавляют 1 мл раствора ванилина в серной

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

кислоте; должно появиться желтое окрашивание, которое при прибавлении 1 мл воды переходит в малиново-красное.

Температура плавления. От 41 до 44 °С (ОФС «Температура плавления»).

Удельное вращение. От – 48° до – 51° (10 % раствор в спирте 96 %, ОФС «Поляриметрия»).

Кислотность или щелочность. К 10 мл раствора, полученного в испытании на «Прозрачность раствора», прибавляют 0,05 мл 0,1 % спиртового раствора метилового красного; розовая окраска должна перейти в желтую от прибавления не более 0,05 мл 0,05 М раствора натрия гидроксида.

Родственные примеси. Определение проводят методом газовой хроматографии (ГХ).

Испытуемый раствор. 0,2 г субстанции растворяют в 50 мл метиленхлорида.

Раствор для проверки пригодности хроматографической системы. 0,02 г субстанции и 0,02 г изоментола растворяют в 50 мл метиленхлорида.

Хроматографические условия

Колонка	стеклянная 2,0 м × 2 мм, заполненная сорбентом 15 % полиэтиленгликоля 1500 на промытом кислотой диатомитовом носителе (например, Хроматон N-AW), 80 – 100 или 100 – 120 меш;
Детектор	пламенно-ионизационный;
Температура:	
колонки	120 °С;
детектора	200 °С;
испарителя	150 °С;
Скорость газа-носителя (азот)	30 мл/мин.

Хроматографируют раствор для проверки пригодности хроматографической системы. Разрешение (*R*) между пиками изоментола и ментола должно быть не менее 1,4.

Хроматографируют по 1 мкл растворителя (метиленхлорида) и испы-

туемого раствора. Время регистрации хроматограммы испытуемого раствора должно не менее чем в 2 раза превышать время удерживания основного пика.

Содержание любой родственной примеси в процентах (X_i) рассчитывают по формуле:

$$X_i = \frac{S_i \cdot 100}{\Sigma S},$$

где S_i – площадь пика примеси;

ΣS – сумма площадей всех пиков, за исключением пика растворителя (метиленхлорида).

Суммарное содержание родственных примесей в субстанции не должно превышать 3,0 %.

Нелетучий остаток. Около 2,0 г (точная навеска) субстанции помещают в фарфоровую чашку и нагревают на водяной бане; образуется бесцветная прозрачная жидкость, которая при дальнейшем нагревании улетучивается. Остаток, высушенный до постоянной массы при температуре от 100 до 105 °С, не должен превышать 0,05 %.

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

Количественное определение. Около 0,7 г (точная навеска) субстанции помещают в колбу с обратным холодильником, прибавляют 10 мл 12 % раствора уксусного ангидрида в безводном пиридине. Нагревают с обратным холодильником на песчаной бане при слабом кипении в течение 2 ч, затем прибавляют через холодильник 25 мл воды и, по охлаждении, титруют образовавшуюся уксусную кислоту 0,5 М раствором натрия гидроксида (индикатор – 0,05 мл 1 % раствора фенолфталеина).

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,5 М раствора натрия гидроксида соответствует 78,14 мг левоментола $C_{10}H_{20}O$.

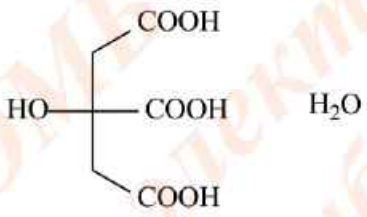
Хранение. В плотно укупоренной упаковке.

Лимонная кислота **ФС.2.1.0024.15**

Лимонной кислоты моногидрат

Acidum citricum **Взамен ФС 42-0008-00**

2-Гидроксипропан-1,2,3-трикарбоновая кислота, моногидрат



$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ М.м. 210,14

Содержит не менее 99,5 % лимонной кислоты $C_6H_8O_7$ в пересчете на безводное вещество.

Описание. Прозрачные бесцветные кристаллы или белый или почти белый кристаллический порошок или бесцветные гранулы. Выветривается в сухом воздухе.

Растворимость. Очень легко растворима в воде, легко или очень легко растворима в спирте 96 %.

Подлинность. Субстанцию предварительно высушивают при температуре 100 – 105 °С в течение 2 ч.

1. ИК-спектр. Инфракрасный спектр поглощения субстанции, полученный

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

в дисках с калия бромидом, в области частот от 4000 до 400 см $^{-1}$ по положению полос поглощения должен соответствовать спектру стандартного образца лимонной кислоты.

2. Качественная реакция. 1 г субстанции растворяют в 10 мл воды; полученный раствор должен окрашивать бумагу конго красного в синий или зеленый цвет.

3. Качественная реакция. 0,05 г субстанции растворяют в 0,5 мл уксусного ангидрида и нагревают; через 20 – 40 с должно появиться розово-фиолетовое окрашивание, переходящее в карминово-красное при прибавлении 0,1 мл пиридина.

4. Качественная реакция. 0,5 г субстанции растворяют в 5 мл воды, нейтрализуют 1 М раствором натрия гидроксида (около 7 мл), прибавляют 10 мл 7,35 % раствора кальция хлорида и нагревают до кипения; появляется осадок белого цвета.

***Прозрачность раствора.** Растворяют 20 г субстанции в свежепрокипяченной и охлажденной воде и разбавляют водой до 100 мл; полученный раствор (раствор 1) должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

50 г субстанции, предназначенной для производства лекарственных препаратов для парентерального применения, растворяют в свежепрокипяченной и охлажденной воде и разбавляют водой до 100 мл; полученный раствор (раствор 2) должен быть прозрачным(ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей») .

***Цветность раствора.** Окраска раствора 1, полученного в испытании на «Прозрачность раствора», не должна превышать эталоны сравнения Y_7, BY_7 или GY_7 (ОФС «Степень окраски жидкостей»).

Для субстанции, предназначенной для производства лекарственных препаратов для парентерального применения, раствор 2, полученный в испытании на «Прозрачность раствора», должен быть бесцветным (ОФС «Степень окраски жидкостей»).

ФЭМБ Федеральный электронный медицинский библиотека

Легко обугливающиеся вещества. 1,0 г субстанции помещают в пробирку, прибавляют 10 мл серной кислоты концентрированной, тотчас нагревают на водяной бане при температуре (90 ± 1) °С точно в течение 60 мин и быстро охлаждают; окраска полученного раствора не должна превышать окраски раствора, состоящего из 1 мл красного раствора и 9 мл желтого раствора (ОФС «Степень окраски жидкостей», метод 1).

Щавелевая кислота. Не более 0,036 %. 0,80 г субстанции растворяют в 4 мл воды, прибавляют 3 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, 1 г цинка гранулированного, кипятят в течение 1 мин и выдерживают в течение 2 мин. Надосадочную жидкость переносят в пробирку, содержащую 0,25 мл 1 % раствора фенилгидразина гидрохлорида, и нагревают до кипения. Раствор переносят в градуированный цилиндр вместимостью 25 мл, быстро охлаждают, прибавляют равный объем хлористоводородной кислоты концентрированной и 0,25 мл 5 % раствора калия феррицианида, перемешивают и выдерживают в течение 30 мин. Интенсивность розовой окраски полученного раствора не должна превышать интенсивность окраски эталонного раствора, приготовленного параллельно таким же образом с использованием 4 мл 0,01 % раствора щавелевой кислоты.

Сульфаты. Не более 0,015 % (ОФС «Сульфаты», метод 2). 2,0 г субстанции растворяют в воде и разбавляют водой до 30 мл.

***Алюминий.** Не более 0,00002 % (ОФС «Алюминий»).

Испытуемый раствор. 20,0 г субстанции растворяют в 100 мл воды.

Эталонный раствор. К 2 мл стандартного раствора алюминий-иона (2 мкг/мл) прибавляют 10 мл ацетатного буферного раствора с pH 6,0 и 98 мл воды и перемешивают.

Контрольный раствор. К 10 мл ацетатного буферного раствора с pH 6,0 прибавляют 100 мл воды и перемешивают.

Тяжелые металлы. Не более 0,002 % (ОФС «Тяжёлые металлы»). 0,5 г субстанции растворяют в 10 мл воды.

Вода. От 7,5 % до 9,0 % (ОФС «Определение воды»). Около 0,5 г (точная

навеска) субстанции растворяют в 20 мл метанола безводного.

Сульфатная зола. Не более 0,1 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

Остаточные органические растворители. В соответствии с требованиями ОФС «Остаточные органические растворители».

***Бактериальные эндотоксины.** Не более 0,5 ЕЭ на 1 мг субстанции (ОФС «Бактериальные эндотоксины»).

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

Количественное определение. Около 0,5 г (точная навеска) субстанции растворяют в 50 мл воды и титруют 1 М раствором натрия гидроксида до появления слабо-розовой окраски (индикатор – 0,5 мл 1 % раствора фенолфталеина).

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 1 М раствора натрия гидроксида соответствует 64,05 мг лимонной кислоты $C_6H_8O_7$.

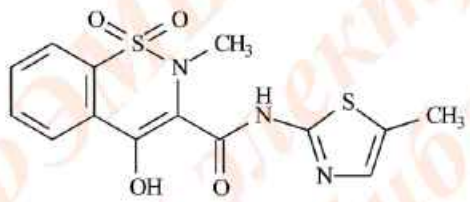
Хранение. В хорошо укупоренной упаковке.

*Контроль по показателям качества «Прозрачность раствора», «Цветность раствора», «Алюминий» и «Бактериальные эндотоксины» проводят в субстанциях, предназначенных для производства лекарственных препаратов для парентерального применения.

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

Мелоксикам	**ФС.2.1.0025.15**
Мелоксикам	
Meloxicamum	**Взамен ГФ XII, ч. 1, ФС 42-0254-07**

4-Гидрокси-2-метил-*N*-(5-метил-1,3-тиазол-2-ил)-1,1-диоксо-1λ^6-2*H*-1,2-бензотиазин-3-карбоксамид



$C_{14}H_{13}N_3O_4S_2$ М. м. 351,40

Содержит не менее 99,0 % и не более 101,0 % мелоксикама $C_{14}H_{13}N_3O_4S_2$ в пересчете на сухое вещество.

Описание. Светло-желтый порошок.

Растворимость. Растворим в диметилформамиде, мало растворим в ацетоне, очень мало растворим в спирте 96 %, практически нерастворим в воде.

Подлинность. 1. *ИК-спектр.* Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области частот от 4000 до 400 см$^{-1}$ по положению полос поглощения должен соответствовать спектру стандартного образца мелоксикама.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

2. *УФ-спектр.* Спектр поглощения 0,0015 % раствора субстанции в метаноле в области длин волн от 240 до 450 нм должен иметь максимум поглощения при 354 нм.

Родственные примеси. Определение проводят методом ВЭЖХ.

*Подвижная фаза А (*ПФ *А).* 1 г калия фосфата однозамещенного растворяют в 1000 мл воды и доводят pH раствора раствором натрия гидроксида до 6,0.

*Подвижная фаза Б (*ПФ *Б).* Метанол.

Испытуемый раствор. 0,04 г субстанции растворяют в смеси 5 мл метанола и 0,3 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида. Полученный раствор разбавляют метанолом до 20 мл и перемешивают.

Раствор сравнения. 2,0 мл испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают. 5,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают.

Раствор для проверки пригодности хроматографической системы. 2 мг субстанции, 2 мг стандартного образца примеси *A* [этил(4-гидрокси-2-метил-1,1-диоксо-1λ^6-2*H*-1,2-бензотиазин-3-карбоксилат)], 2 мг стандартного образца примеси *B* (5-метил-1,3-тиазол-2-амин), 2 мг стандартного образца примеси *C* {4-гидрокси-2-метил-*N*-[(2*Z*)-3,5-диметил-1,3-тиазол-2(3*H*)-илиден]-1,1-диоксо-1λ^6-2*H*-1,2-бензотиазин-3-карбоксамид} и 2 мг стандартного образца примеси *D* {4-гидрокси-2-метил-*N*-[(2*Z*)-5-метил-3-этил-1,3-тиазол-2(3*H*)-илиден]-1,1-диоксо-1λ^6-2*H*-1,2-бензотиазин-3-карбоксамид} растворяют в смеси 5 мл метанола и 0,3 мл 1 М раствора натрия гидроксида. Полученный раствор разбавляют метанолом до 25 мл и перемешивают.

Хроматографические условия

Колонка	150 мм × 4,6 мм с октадецилсилилсиликагелем (С18), 5 мкм;

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Градиентное элюирование:

Время, мин	ПФ *А*, %	ПФ *Б*, %
0 – 2	60	40
2 – 10	60→30	40→70
10 – 15	30	70

Скорость потока 1,0 мл/мин;

Температура колонки 45 °С;

Детектор спектрофотометрический, 260 нм и 350 нм;

Объем пробы 10 мкл.

Хроматографируют раствор для проверки пригодности хроматографической системы. Время удерживания пика мелоксикама должно быть около 7 мин. Относительное время удерживания пика примеси *В* – около 0,5, примеси *А* – около 1,4, примеси *С* – около 1,7 примеси *D* – около 1,9.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- разрешение (*R*) между пиками мелоксикама и примеси *А* не менее 3,0 при 350 нм,

- разрешение (*R*) между пиками мелоксикама и примеси *В* не менее 3,0 при 260 нм.

Хроматографируют раствор сравнения при 350 нм и испытуемый раствор при 260 нм и 350 нм.

Площадь пика примеси *А*, примеси *С* и примеси *D* на хроматограмме испытуемого раствора при 350 нм должна быть не более половины площади пика мелоксикама на хроматограмме раствора сравнения при 350 нм (не более 0,1 % примеси *А* с учетом относительного фактора отклика, равного 0,5, и не более 0,05 % примеси *С* и примеси *D*); площадь пика примеси *В* на хроматограмме испытуемого раствора при 260 нм должна быть не более

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

площади пика мелоксикама на хроматограмме раствора сравнения при 350 нм (не более 0,1 %); площадь пика любой неидентифицированной примеси на хроматограмме испытуемого раствора при длине волны наибольшего отклика (260 нм или 350 нм) должна быть не более площади пика мелоксикама на хроматограмме раствора сравнения при 350 нм (не более 0,1 %). Суммарная площадь пиков примесей должна не более чем в 3 раза превышать площадь пика мелоксикама на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,3 %).

Не учитывают пики, площадь которых составляет 0,3 и менее от площади пика мелоксикама на хроматограмме раствора сравнения при соответствующей длине волны.

Потеря в массе при высушивании. Не более 0,5 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

Сульфатная зола. Не более 0,1 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

Тяжелые металлы. Не более 0,001 %. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Тяжёлые металлы» в зольном остатке, полученном после сжигания 1,0 г субстанции (ОФС «Сульфатная зола»).

Остаточные органические растворители. В соответствии с требованиями ОФС «Остаточные органические растворители».

***Бактериальные эндотоксины.** Не более 23,3 ЕЭ на мг мелоксикама (ОФС «Бактериальные эндотоксины»).

10 мг (точная навеска) субстанции растворяют в 1 мл диметилформамида. К 0,1 мл исходного раствора добавляют 0,9 мл диметилформамида. Для проведения анализа полученный раствор разводят водой для ЛАЛ-теста не менее чем в 64 раза.

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

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

Количественное определение. Около 0,25 г (точная навеска) субстанции растворяют в смеси 50 мл уксусной кислоты ледяной и 5 мл муравьиной кислоты безводной и титруют 0,1 М раствором хлорной кислоты. Конечную точку титрования определяют потенциометрически.

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,1 М раствора хлорной кислоты соответствует 35,14 мг мелоксикама $C_{14}H_{13}N_3O_4S_2$.

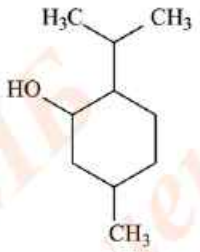
Хранение. В хорошо укупоренной упаковке, в защищенном от света месте.

*Контроль по показателю качества «Бактериальные эндотоксины» проводят в субстанциях, предназначенных для производства лекарственных препаратов для парентерального применения.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Рацементол	**ФС.2.1.0026.15**
Ментол рацемический	**Взамен ГФ X, ст. 387;**
Racementholum	**взамен ФС 42-1866-97**

(±)-*c*-5-Метил-*t*-2-(пропан-2-ил)циклогексан-*r*-1-ол



$C_{10}H_{20}O$ М. м. 156,27

Содержит не менее 99,0 % рацементола $C_{10}H_{20}O$.

Описание. Бесцветные кристаллы или белый кристаллический порошок или плавящаяся масса с сильным запахом мяты перечной.

Растворимость. Очень легко растворим в спирте 96 %, эфире, уксусной кислоте, легко растворим в жидком парафине и жирных маслах, очень мало растворим в воде.

Подлинность

1. ИК-спектр. Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области частот от 4000 до 400 $см^{-1}$ по положению полос поглощения должен соответствовать рисунку спектра ментола рацемического (Приложение).

2. Качественная реакция. 0,01 г субстанции растворяют в 1 мл серной

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

кислоты концентрированной и прибавляют 1 мл раствора ванилина в серной кислоте; должно появиться желтое окрашивание, которое при прибавлении 1 мл воды переходит в малиново-красное.

Температура затвердевания. От 27 до 32 °С (ОФС «Температура затвердевания»).

Угол вращения. От – 0,2° до + 0,2° (10 % раствор в спирте 96 %, ОФС «Поляриметрия»).

Прозрачность раствора. Раствор 1 г субстанции в 10 мл спирта 96 % должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

Цветность раствора. Раствор, полученный в испытании «Прозрачность раствора», должен быть бесцветным (ОФС «Степень окраски жидкостей»).

Кислотность. К 10 мл раствора, полученного в испытании «Прозрачность раствора», прибавляют 0,05 мл 0,1 % спиртового раствора метилового красного; розовая окраска должна перейти в желтую от прибавления не более 0,5 мл 0,05 М раствора натрия гидроксида.

Родственные примеси. Определение проводят методом газовой хроматографии (ГХ).

Испытуемый раствор. 0,2 г субстанции растворяют в 50 мл метиленхлорида.

Раствор для проверки пригодности хроматографической системы. 0,02 г субстанции и 0,02 г изоментола растворяют в 50 мл метиленхлорида.

Хроматографические условия

Колонка	стеклянная 2,0 м × 2 мм, заполненная сорбентом 15 % полиэтиленгликоля 1500 на промытом кислотой диатомитовом носителе (например, Хроматоне N-AW), 80 – 100 или 100 – 120 меш;
Детектор	пламенно-ионизационный;

Федеральный электронный медицинский библиотека ЭЭМБ

Температура:

колонки	120 ^{0}C;
детектора	200 ^{0}C;
испарителя	150 ^{0}C;

Скорость газа-носителя (азот) 30 мл/мин.

Хроматографируют раствор для проверки пригодности хроматографической системы. Разрешение (R) между пиками изоментола и ментола должно быть не менее 1,4.

Хроматографируют по 1 мкл растворителя (метиленхлорида) и испытуемого раствора. Время регистрации хроматограммы испытуемого раствора должно не менее чем в 2 раза превышать время удерживания основного пика.

Содержание любой родственной примеси в процентах (X_i) рассчитывают по формуле:

$$X_i = \frac{S_i \cdot 100}{\Sigma S}$$

где S_i – площадь пика примеси;

ΣS – сумма площадей всех пиков, за исключением пика растворителя (метиленхлорида).

Суммарное содержание родственных примесей в субстанции не должно превышать 3,0 %.

Нелетучий остаток. Не более 0,05%. Около 2,0 г (точная навеска) субстанции помещают в фарфоровую чашку и нагревают на водяной бане; образуется бесцветная прозрачная жидкость, которая при дальнейшем нагревании улетучивается. Сушат до постоянной массы при температуре от 100 до 105 °С.

Легко окисляющиеся вещества. 0,5 г субстанции помещают в сухую пробирку, прибавляют 10 мл раствора калия перманганата, приготовленного разбавлением 3 мл 0,1 М раствора калия перманганата водой до 100 мл, и

пробирку с содержимым помещают в водяную баню с температурой от 40 до 50 °С. Каждые 30 с пробирку вынимают из водяной бани и встряхивают; пурпурное окрашивание должно сохраняться в течение 5 мин.

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

Количественное определение. Около 0,7 г (точная навеска) субстанции помещают в колбу с обратным холодильником, прибавляют 10 мл 12 % раствора уксусного ангидрида в безводном пиридине. Нагревают с обратным холодильником на песчаной бане при слабом кипении в течение 2 ч, затем прибавляют через холодильник 25 мл воды и, по охлаждении, титруют образовавшуюся уксусную кислоту 0,5 М раствором натрия гидроксида (индикатор – 0,05 мл 1 % раствора фенолфталеина).

Параллельно проводят контрольный опыт.

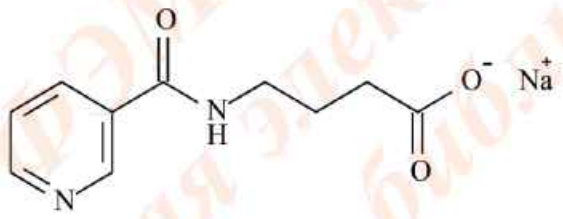
1 мл 0,5 М раствора натрия гидроксида соответствует 78,14 мг рацементола $C_{10}H_{20}O$.

Хранение. В плотно укупоренной упаковке, в защищенном от света месте.

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

Натриевая соль *N*-никотиноил гамма-аминомасляной кислоты	**ФС.2.1.0027.15**
Натриевая соль *N*-никотиноил гамма-аминомасляной кислоты	
Natrii *N*-nicotinoyl γ-aminobutiras	**Взамен ФС 42-2862-98**

4-(Пиридин-3-карбоксамидо)бутаноат натрия



$C_{10}H_{11}N_2NaO_3$ М. м. 230,20

Содержит не менее 98,0 % натриевой соли *N*-никотиноил гамма-аминомасляной кислоты $C_{10}H_{11}N_2NaO_3$ в пересчете на сухое вещество.

Описание. Белый кристаллический порошок без запаха; гигроскопичен.

Растворимость. Легко растворим в воде, умеренно растворим в спирте 96 %, практически нерастворим в хлороформе.

Подлинность

1. ИК-спектр. Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области частот от 4000 до 400 $см^{-1}$ по положению полос

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

поглощения должен соответствовать спектру стандартного образца натриевой соли *N*-никотиноил гамма-аминомасляной кислоты.

2. УФ-спектр. Ультрафиолетовый спектр поглощения 0,002 % раствора субстанции в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты в области длин волн от 230 нм до 300 нм должен иметь максимум при 262 нм.

3. Качественная реакция. К 0,02 г субстанции прибавляют 0,01 г лимонной кислоты, 0,5 мл уксусного ангидрида и нагревают на водяной бане в течение 2 мин; должно появиться интенсивное фиолетово-красное окрашивание.

4. Качественная реакция. Субстанция даёт характерную реакцию Б на натрий (ОФС «Общие реакции на подлинность»).

***Прозрачность раствора**. Раствор 0,25 г субстанции в 5 мл воды должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

***Цветность раствора**. Окраска раствора, полученного в испытании на «Прозрачность раствора», не должна превышать эталон Y_7 (ОФС «Степень окраски жидкостей»).

pH. От 7,3 до 8,5 (5 % раствор, ОФС «Ионометрия», метод 3).

Родственные примеси. Испытание проводят методом тонкослойной хроматографии (ТСХ).

Испытуемый раствор. 0,2 г субстанции растворяют в 10 мл спирта 96 %.

Стандартный раствор А – 0,02 % раствор стандартного образца никотиновой кислоты в спирте. 0,02 г стандартного образца никотиновой кислоты растворяют в 70 мл спирта 96 % в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают.

Срок годности раствора 1 мес.

Стандартный раствор Б – 0,01 % водно-спиртовой раствор стандартного образца гамма-аминомасляной кислоты. 0,01 г гамма-аминомасляной кислоты растворяют в 5 мл воды в мерной колбе

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

вместимостью 100 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают.

Срок годности раствора 1 мес.

Раствор для опрыскивания – 0,2 % раствор нингидрина в спирте 96 %. 0,05 г нингидрина растворяют в 20 мл спирта 96 %, доводят объем раствора спиртом 96 % до 25 мл и перемешивают.

Срок годности раствора 1 мес.

Раствор для проверки пригодности хроматографической системы.

5 мл испытуемого раствора переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют по 20 мл стандартных растворов *А* и *Б*, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают.

На линию старта пластинки со слоем силикагеля 60 F_{254} наносят 0,005 мл (100 мкг) испытуемого раствора, 0,002 мл (0,4 мкг) стандартного раствора *А*, 0,001 мл (0,1 мкг) стандартного раствора *Б* и 0,005 мл раствора для проверки пригодности хроматографической системы. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру со смесью углерода тетрахлорид – метанол – уксусная кислота ледяная (30:7:4) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат на воздухе в течение 10 мин и просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм.

Пятно примеси на хроматограмме испытуемого раствора, находящееся на уровне пятна никотиновой кислоты, по величине и интенсивности поглощения не должно превышать пятно на хроматограмме стандартного раствора *А* (не более 0,4 %).

Допускается контур пятна (ион натрия) с $R_f < 1$ по основному веществу.

Затем пластинку опрыскивают 0,2 % раствором нингидрина в спирте 96 % и нагревают в течение 15 мин при температуре от 110 °С до 120 °С.

Красно-фиолетовое пятно примеси на хроматограмме испытуемого раствора, находящееся на уровне пятна гамма-аминомасляной кислоты, не должно превышать по величине и интенсивности окраски пятно на хроматограмме стандартного раствора *Б* (не более 0,1 %).

Допускается желтое пятно (ион натрия), расположенное между основным пятном, поглощающим в УФ-свете, и пятном гамма-аминомасляной кислоты.

Результаты испытания считаются достоверными, если на хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы четко видны 2 пятна, проявляющиеся при просматривании пластинки в УФ-свете, и 1 пятно, проявляющееся после опрыскивания пластинки раствором нингидрина.

Потеря в массе при высушивании. Не более 3,0 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

Остаточные органические растворители. В соответствии с требованиями ОФС «Остаточные органические растворители».

***Бактериальные эндотоксины.** Не более 1,7 ЕЭ на 1 мг натриевой соли *N*-никотиноил гамма-аминомасляной кислоты (ОФС «Бактериальные эндотоксины»). Для проведения испытания готовят исходный раствор субстанции 50 мг/мл, а затем разводят его не менее чем в 400 раз.

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

Количественное определение. Около 0,15 г (точная навеска) субстанции помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 20 мл уксусной кислоты ледяной, прибавляют 1 мл уксусного ангидрида и титруют 0,1 М раствором хлорной кислоты до зеленого окрашивания (индикатор – 0,3 мл 0,1 % раствора кристаллического фиолетового).

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,1 М раствора хлорной кислоты соответствует 11,51 мг натриевой соли *N*-никотиноил гамма-аминомасляной кислоты $C_{10}H_{11}N_2NaO_3$.

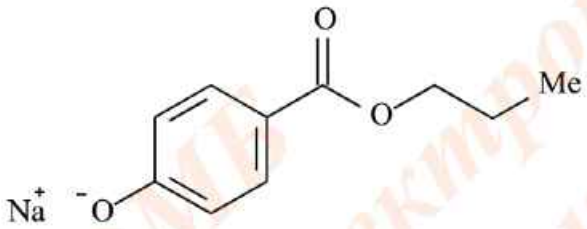
Хранение. В хорошо укупоренной упаковке, в защищенном от света месте.

*Контроль по показателям качества «Прозрачность раствора», «Цветность раствора», «Бактериальные эндотоксины» проводят в субстанциях, предназначенных для производства лекарственных препаратов для парентерального применения.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Натрия пропилпарагидроксибензоат	**ФС.2.1.0028.15**
Натрия пропилпарагидроксибензоат	
Propylis parahydroxybenzoas natricus	**Взамен ФС 42-0201-07**

4-(Пропилоксикарбонил)фенолят натрия



$C_{10}H_{11}NaO_3$ М.м. 202,18

Содержит не менее 99,0 % и не более 104,0 % натрия пропилпарагидроксибензоата $C_{10}H_{11}NaO_3$ в пересчете на безводное вещество.

Описание. Белый или почти белый кристаллический порошок; гигроскопичен.

Растворимость. Легко растворим в воде, умеренно растворим в спирте 96 %, практически нерастворим в метиленхлориде.

Подлинность

1. ИК-спектр. 0,5 г субстанции растворяют в 50 мл воды, прибавляют 5 мл хлористоводородной кислоты 25 %, фильтруют, промывают осадок на фильтре водой и высушивают под вакуумом при температуре 80 °С в течение 2 ч. Инфракрасный спектр полученного осадка, снятый в диске с калия бромидом, в области частот от 4000 до 400 $см^{-1}$ по положению полос поглощения

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

должен соответствовать спектру стандартного образца пропилпарагидроксибензоата.

2. Тонкослойная хроматография

Основное пятно на хроматограмме испытуемого раствора *Б*, полученной при определении родственных примесей, по положению, интенсивности поглощения и величине должно соответствовать основному пятну на хроматограмме раствора сравнения *Б* пропилпарагидроксибензоата.

3. Качественная реакция. 5,0 г субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в свежепрокипяченной охлажденной воде, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (раствор *А*).

К 1 мл раствора *А* прибавляют 1 мл воды, полученный раствор даёт характерную реакцию А на натрий (ОФС «Общие реакции на подлинность»).

Прозрачность раствора. Раствор *А*, полученный в испытании «Подлинность», должен быть прозрачным.

Цветность раствора. Окраска раствора *А*, полученного в испытании «Подлинность», не должна превышать эталон BY_6 (ОФС «Степень окраски жидкостей»).

pH. От 9,5 до 10,5 (0,1 % раствор, ОФС «Ионометрия», метод 3).

Родственные примеси. Тонкослойная хроматография (ТСХ)

Испытуемый раствор А. 0,1 г субстанции растворяют в 10 мл воды, прибавляют 2 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и встряхивают с 50 мл эфира. Выпаривают эфирный слой досуха и остаток растворяют в 10 мл ацетона.

Испытуемый раствор Б. 1,0 мл испытуемого раствора *А* переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объём раствора ацетоном до метки и перемешивают.

Раствор сравнения А. 0,5 мл испытуемого раствора *А* переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора ацетоном до метки и перемешивают.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Раствор сравнения Б. 0,01 г стандартного образца пропилпарагидроксибензоата помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора ацетоном до метки и перемешивают.

Раствор сравнения В. 0,01 г стандартного образца этилпарагидроксибензоата помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, прибавляют 1,0 мл испытуемого раствора *А*, доводят объем раствора ацетоном до метки и перемешивают.

Раствор сравнения Г. 0,035 г 4-гидроксибензойной кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в ацетоне, доводят объем раствора ацетоном до метки и перемешивают.

На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля КС 18 F_{254} или аналогичной наносят по 5 мкл испытуемого раствора *А* (50 мкг), испытуемого раствора *Б* (5 мкг) и растворов сравнения *А* (0,25 мкг), *Б* (5 мкг стандартного образца пропилпарагидроксибензоата), *В* (по 5 мкг пропилпарагидроксибензоата и стандартного образца этилпарагидроксибензоата) и *Г* (1,75 мкг 4-гидроксибензойной кислоты).

Пластинку сушат на воздухе в течение 5 мин, помещают в камеру со смесью растворителей уксусная кислота ледяная – вода – метанол (1:30:70) и хроматографируют восходящим методом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм.

На хроматограмме испытуемого раствора *А* допускается наличие пятна, расположенного на уровне пятна на хроматограмме раствора сравнения *Г*, не превышающего его по величине и интенсивности поглощения (не более 3,5 % 4-гидроксибензойной кислоты). Любое дополнительное пятно на хроматограмме испытуемого раствора *А* по величине и интенсивности поглощения не должно превышать пятно на хроматограмме раствора сравнения *А* (не более 0,5 %).

Пятно на линии старта не учитывают.

Результаты анализа считаются достоверными, если на хроматограмме раствора сравнения *B* четко обнаруживаются 2 пятна.

Хлориды. Не более 0,035 % (ОФС «Хлориды»). Для определения используют эталонный раствор, содержащий 7 мл стандартного раствора хлорид-иона (2 мкг/мл) и 3 мл воды. 10 мл раствора *A*, полученного в испытании «Подлинность», помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 30 мл воды, 1 мл азотной кислоты концентрированной, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают и фильтруют. К 2 мл фильтрата прибавляют 8 мл воды.

Сульфаты. Не более 0,03 % (ОФС «Сульфаты», метод 2). 25 мл раствора *A*, полученного в испытании на «Подлинность», помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 5 мл воды, 10 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают и фильтруют. К 10 мл фильтрата прибавляют 5 мл воды.

Вода. Не более 5,0 % (ОФС «Определение воды»). Для определения используют около 0,5 г (точная навеска) субстанции.

Тяжёлые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Тяжёлые металлы», метод 2).

1,0 г субстанции помещают в тигель, прибавляют 2 мл 25 % раствора магния сульфата в серной кислоте разведённой 9,8 %, перемешивают с помощью тонкой стеклянной палочки, осторожно нагревают до получения сухого остатка и прокаливают в муфельной печи при температуре не выше 800 °С до тех пор, пока цвет остатка не станет белым или слегка сероватым. К остатку прибавляют 0,2 мл серной кислоты разведённой 9,8 %, выпаривают и снова прокаливают. Общая продолжительность прокаливания не должна превышать 2 ч. Остаток после прокаливания растворяют в 2 порциях по 2,5 мл хлористоводородной кислоты разведённой 7,3 %, прибавляют 0,1 мл 1 % раствора фенолфталеина и аммиак водный по каплям до появления розового окрашивания. После охлаждения прибавляют уксусную кислоту ледяную до

обесцвечивания раствора и еще 0,25 мл. При необходимости раствор фильтруют, доводят объем раствора водой до 10 мл и перемешивают.

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

Количественное определение. Около 0,15 г (точная навеска) субстанции растворяют в 50 мл уксусной кислоты ледяной. Полученный раствор титруют 0,1 М раствором хлорной кислоты. Конечную точку титрования определяют потенциометрически.

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,1 М раствора хлорной кислоты соответствует 20,22 мг натрия пропилпарагидроксибензоата $C_{10}H_{11}NaO_3$.

Хранение. В плотно укупоренной упаковке, в защищенном от света месте.

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

Нифедипин **ФС.2.1.0029.15**

Нифедипин

Nifedipinum **Взамен ВФС 42-1457-84**

Диметил[2,6-диметил-4-(2-нитрофенил)-1,4-дигидропиридин-3,5-дикарбоксилат]



$C_{17}H_{18}N_2O_6$ М. м. 346,33

Содержит не менее 98,0 % и не более 102,0 % нифедипина $C_{17}H_{18}N_2O_6$ в пересчете на сухое вещество.

При проведении испытаний растворы защищают от света и используют сразу же после приготовления.

Описание. Желтый кристаллический порошок.

Растворимость. Легко растворим в ацетоне, умеренно растворим в спирте 96 %, практически нерастворим в воде.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Подлинность

1. *ИК-спектр.* Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области частот от 4000 до 400 $см^{-1}$ по положению полос поглощения должен соответствовать спектру стандартного образца нифедипина.

2. *Тонкослойная хроматография*

Испытуемый раствор. 0,010 г субстанции растворяют в 10 мл метанола.

Раствор стандартного образца. 0,010 г стандартного образца нифедипина растворяют в 10 мл метанола.

На линию старта пластинки со слоем силикагеля 60 F_{254} наносят по 5 мкл (5 мкг) испытуемого раствора и раствора стандартного образца. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру со смесью растворителей этилацетат – циклогексан (40:60) и хроматографируют восходящим методом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм.

Основное пятно на хроматограмме испытуемого раствора по положению, интенсивности поглощения и величине должно соответствовать пятну на хроматограмме раствора стандартного образца нифедипина.

3. *Качественная реакция*

1 % раствор натрия нитрита. 10 мл 10 % раствора натрия нитрита разбавляют водой до 100 мл.

Раствор нафтилэтилендиамина дигидрохлорида. 0,5 г нафтилэтилендиамина дигидрохлорида растворяют в 100 мл воды.

Раствор аммония сульфамата. 5 г аммония сульфамата растворяют в 100 мл воды.

0,025 г субстанции помещают в пробирку, прибавляют 10 мл смеси хлористоводородная кислота концентрированная – вода – спирт 96 %

(1,5:3,5:5) и нагревают до растворения. Прибавляют 0,5 г цинка гранулированного и оставляют на 5 мин. Полученный раствор фильтруют, прибавляют к фильтрату 5 мл 1 % раствора натрия нитрита и оставляют на 2 мин. Прибавляют 2 мл раствора аммония сульфамата, энергично встряхивают и прибавляют 2 мл раствора нафтилэтилендиамина дигидрохлорида. Должно появиться красное окрашивание, не исчезающее в течение 5 мин.

Температура плавления. От 171 до 175 °С (ОФС «Температура плавления»).

Примеси основного характера. Не более 0,14 %. Около 4,0 г (точная навеска) субстанции растворяют на ультразвуковой бане в 160 мл уксусной кислоты ледяной. Полученный раствор титруют 0,1 М раствором хлорной кислоты до изменения окраски раствора от коричневато-желтой до зеленой (индикатор – 0,25 мл 0,2 % раствора нафтолбензеина).

Параллельно проводят контрольный опыт.

На титрование должно пойти не более 0,48 мл 0,1 М раствора хлорной кислоты.

Родственные примеси. Определение проводят методом ВЭЖХ.

Подвижная фаза (ПФ). Ацетонитрил – метанол – вода (9:36:55).

Испытуемый раствор. Около 0,1 г (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 10 мл метанола, доводят объем раствора ПФ до метки и перемешивают.

Раствор стандартного образца примеси А. Около 0,1 г (точная навеска) примеси *А* нифедипина (диметил[2,6-диметил-4-(2-нитрофенил)пиридин-3,5-дикарбоксилат]) помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в метаноле, доводят объем раствора метанола до метки и перемешивают.

Раствор стандартного образца примеси В. Около 0,1 г (точная навеска) примеси *В* нифедипина (диметил[2,6-диметил-4-(2-нитрозофенил)пиридин-3,5-дикарбоксилат]) помещают в мерную колбу

вместимостью 25 мл, растворяют в метаноле, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают.

Раствор для проверки пригодности хроматографической системы. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,5 мл раствора стандартного образца примеси *A,* 0,5 мл раствора стандартного образца примеси *B* и 0,5 мл испытуемого раствора, доводят объем раствора ПФ до метки и перемешивают. 5 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора ПФ до метки и перемешивают.

Хроматографические условия

Колонка	15 × 0,46 см с октадецилсиликагелем (С18), 5 мкм;
Скорость потока	1,0 мл/мин;
Детектор	спектрофотометрический, 235 нм;
Объем пробы	20 мкл.

Хроматографируют раствор для проверки пригодности хроматографической системы и испытуемый раствор. Время регистрации хроматограммы испытуемого раствора должно не менее чем в 2 раза превышать время удерживания основного пика. Порядок элюирования пиков: примесь *A*, примесь *B*, нифедипин.

Время удерживания нифедипина около 15 мин. Относительное время удерживания примеси *A* – около 0,65; примеси *B* – около 0,80.

Разрешение (*R*) между пиками примеси *A* и примеси *B* должно быть не менее 1,5, между пиками примеси *B* и нифедипина – не менее 1,5.

На хроматограмме испытуемого раствора площади пиков примесей *A* и *B* не должны превышать площади соответствующих пиков на хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы (не более 0,1 %); ни один из пиков, кроме основного пика и пиков примеси *A* и примеси *B*, не должен иметь площадь, превышающую площадь пика нифедипина на хроматограмме раствора для проверки пригодности

хроматографической системы (не более 0,1 %). Сумма площадей пиков всех примесей не должна превышать 0,3 %.

Не учитывают пики с площадью менее 0,1 площади пика нифедипина на хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы (0,01 %).

Потеря в массе при высушивании. Не более 0,5 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

Хлориды. Не более 0,02 % (ОФС «Хлориды»). 0,25 г субстанции взбалтывают в течение 10 мин с 25 мл воды и фильтруют. Для анализа отбирают 10 мл фильтрата.

Сульфаты. Не более 0,05 % (ОФС «Сульфаты»). 0,5 г субстанции взбалтывают в течение 10 мин с 25 мл воды и фильтруют. Для анализа отбирают 10 мл фильтрата.

Сульфатная зола. Не более 0,1% (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

Тяжелые металлы. Не более 0,001 %. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Тяжёлые металлы» в зольном остатке, полученном после сжигания 1,0 г субстанции (ОФС «Сульфатная зола»).

Остаточные органические растворители. В соответствии с требованиями ОФС «Остаточные органические растворители».

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

Количественное определение. Около 0,13 г (точная навеска) субстанции растворяют в смеси 25 мл 2-метил-2-пропанола и 25 мл хлорной кислоты разведенной и титруют 0,1 М раствором церия(IV) сульфата (индикатор – 0,1 мл раствора ферроина) до исчезновения розовой окраски раствора.

Параллельно проводят контрольный опыт.

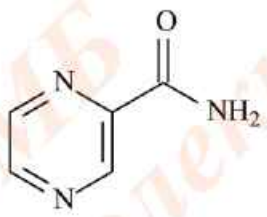
1 мл 0,1 М раствора церия(IV) сульфата соответствует 17,32 мг нифедипина $C_{17}H_{18}N_2O_6$.

Хранение. В плотно укупоренной упаковке, в защищенном от света месте.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Пиразинамид	**ФС.2.1.0030.15**
Пиразинамид	
Pyrazinamidum	**Взамен ВФС 42-3177-98**

Пиразин-2-карбоксамид



$C_5H_5N_3O$ М. м. 123,11

Содержит не менее 99,0 % пиразинамида $C_5H_5N_3O$ в пересчете на безводное вещество.

Описание. Белый кристаллический порошок.

Растворимость. Умеренно растворим в воде, мало растворим в спирте 96 % и метиленхлориде.

Подлинность

1. ИК-спектр. Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области частот от 4000 до 400 $см^{-1}$ по положению полос поглощения должен соответствовать спектру стандартного образца пиразинамида.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

2. УФ-спектр. Ультрафиолетовый спектр поглощения 0,005 % раствора субстанции в воде в области длин волн от 290 до 350 нм должен иметь максимум поглощения при 310 нм.

3. УФ-спектр. Ультрафиолетовый спектр поглощения 0,001 % раствора субстанции в воде в области длин волн от 230 до 290 нм должен иметь максимум поглощения при 268 нм (удельный показатель поглощения от 640 до 680).

4. Качественная реакция. 0,1 г субстанции растворяют в 5 мл воды, прибавляют 1 мл 0,45 % раствора железа(II) сульфата в хлористоводородной кислоте; должно появиться оранжевое окрашивание. При добавлении 1 мл раствора натрия гидроксида разведенного 8,5 % раствор должен окраситься в темно-синий цвет.

Температура плавления. От 188 до 191 °С (ОФС «Температура плавления»).

Кислотность или щелочность. 0,25 г субстанции растворяют в 25 мл воды, свободной от углерода диоксида, и перемешивают. К полученному раствору прибавляют 0,05 мл 0,1 % раствора фенолфталеина и 0,2 мл 0,01 М раствора натрия гидроксида; раствор окрашивается в розовый цвет. Прибавляют 1,0 мл 0,01 М раствора хлористоводородной кислоты, раствор обесцвечивается. Прибавляют 0,15 мл 0,04 % раствора метилового красного; раствор окрашивается в красный цвет.

Родственные примеси. Определение проводят методом тонкослойной хроматографии (ТСХ).

Испытуемый раствор. 0,1 г субстанции растворяют в 10 мл смеси метанол – метиленхлорид (1:9).

Раствор сравнения. 1 мл испытуемого раствора разбавляют смесью метанол – метиленхлорид (1:9) до 50 мл. 1 мл полученного раствора разбавляют смесью метанол – метиленхлорид (1:9) до 10 мл.

Раствор для проверки пригодности хроматографической системы. 0,01 г стандартного образца никотиновой кислоты растворяют в 5 мл смеси

метанол – метиленхлорид (1:9). Прибавляют 1 мл испытуемого раствора и доводят объём раствора до 10 мл смесью метанол – метиленхлорид (1:9).

На линию старта пластинки со слоем силикагеля 60 F_{254} наносят 20 мкл (200 мкг) испытуемого раствора, 20 мкл (0,4 мкг) раствора сравнения и 20 мкл раствора для проверки пригодности хроматографической системы. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру со смесью уксусная кислота ледяная – вода – бутанол (20:20:60) и хроматографируют восходящим методом. Когда фронт подвижной фазы пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и просматривают в УФ-свете при 254 нм.

Любое дополнительное пятно на хроматограмме испытуемого раствора не должно превышать по величине и интенсивности поглощения пятно на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,2 %). Допустимое количество посторонних пятен на хроматограмме испытуемого раствора – не более 3.

Результаты испытания считаются достоверными, если на хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы наблюдается четкое разделение 2 пятен.

Вода. Не более 0,5 % (ОФС «Определение воды»). Для определения используют около 2,0 г (точная навеска) субстанции.

Сульфатная зола. Не более 0,1 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

Тяжелые металлы. Не более 0,001 %. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Тяжёлые металлы» в зольном остатке, полученном после сжигания 1,0 г субстанции (ОФС «Сульфатная зола»).

Остаточные органические растворители. В соответствии с требованиями ОФС «Остаточные органические растворители».

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

Количественное определение. Около 0,1 г (точная навеска) субстанции растворяют в 50 мл уксусного ангидрида и титруют полученный раствор 0,1 М раствором хлорной кислоты. Конечную точку титрования определяют потенциометрически.

Параллельно проводят контрольный опыт.

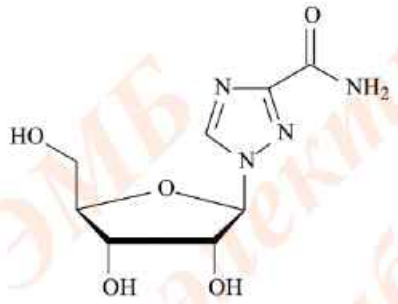
1 мл 0,1 М раствора хлорной кислоты соответствует 12,31 мг пиразинамида $C_5H_5N_3O$.

Хранение. В хорошо укупоренной упаковке, в защищенном от света месте.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Рибавирин	**ФС.2.1.0031.15**
Рибавирин	
Ribavirinum	**Взамен ВФС 42-1601-86**

1-(β-*D*-Рибофуранозил)-1*H*-1,2,4-триазол-3-карбоксамид



$C_8H_{12}N_4O_5$ М. м. 244,20

Содержит не менее 98,5 % и не более 101,5 % рибавирина $C_8H_{12}N_4O_5$ в пересчете на сухое вещество.

Описание. Белый или почти белый кристаллический порошок. Проявляет полиморфизм.

Растворимость. Легко растворим в воде, мало растворим в спирте 96 %, мало или очень мало растворим в метиленхлориде.

Подлинность

1. *ИК-спектр.* Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области частот от 4000 до 400 $см^{-1}$ по положению полос поглощения должен соответствовать спектру стандартного образца рибавирина.

2. *Тонкослойная хроматография*

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Испытуемый раствор. 0,01 г субстанции помещают пробирку, растворяют в 1 мл воды и перемешивают.

Раствор стандартного образца рибавирина. 0,01 г стандартного образца рибавирина помещают в пробирку, растворяют в 1 мл воды и перемешивают.

Раствор анисового альдегида. 5 мл анисового альдегида смешивают с 90 мл спирта 96 %, 5 мл серной кислоты концентрированной и 1 мл уксусной кислоты ледяной.

На линию старта пластинки Силикагель 60 наносят по 0,01 мл испытуемого раствора (100 мкг рибавирина) и раствора стандартного образца рибавирина (100 мкг). Пластинку с нанесенными пробами сушат в токе воздуха в течение 10 мин, помещают в камеру со смесью 0,1 М раствор аммония хлорида – ацетонитрил (2:9) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат в токе воздуха в течение 15 мин, опрыскивают раствором анисового альдегида, затем сушат при температуре 110 °С в течение 30 мин и просматривают.

Пятно на хроматограмме испытуемого раствора по положению, окраске и величине должно соответствовать пятну на хроматограмме раствора стандартного образца рибавирина.

Удельное вращение. От – 33° до – 37° в пересчете на сухое вещество (1 % раствор субстанции, ОФС «Поляриметрия»). Измерение проводят в течение 10 мин после приготовления раствора.

***Прозрачность раствора.** Раствор 0,2 г субстанции в 10 мл воды должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

***Цветность раствора.** Раствор, полученный в испытании «Прозрачность раствора», должен быть бесцветным (ОФС «Степень окраски жидкостей»).

pH. От 4,0 до 6,5 (2 % раствор, ОФС «Ионометрия», метод 3).

Федеральный электронный медицинский библиотека ФЭМБ

Родственные примеси. Определение проводят методом ВЭЖХ.

Раствор А. 0,1 % раствор трифторуксусной кислоты. 1 г трифторуксусной кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают, фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и дегазируют.

Раствор В. 450 мл раствора *А* смешивают с 50 мл метанола и дегазируют.

Испытуемый раствор. Около 0,02 г (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 50 мл раствора *А*, доводят объем раствора раствором *А* до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Раствор сравнения. 1,0 мл испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 200 мл, доводят объем раствора раствором *А* до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Раствор для проверки пригодности хроматографической системы.

5 мг стандартного образца рибавирина и 5 мг гуанозина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 25 мл раствора *А*, доводят объем раствора раствором *А* до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Хроматографические условия

Колонка	150 мм × 3 мм с октадецилсиланом (С 18), 3,5 мкм;
Подвижная фаза (ПФ)	ПФ *А*: 0,1 % раствор трифторуксусной кислоты; ПФ *В*: смесь раствора *А* и метанола (90:10);
Температура колонки	30 °С;
Скорость потока	0,4 мл/мин;
Детектор	спектрофотометрический, 210 нм:

ФЭМБ Республиканская медицинская электронная библиотека

Объем пробы 20 мкл.

Градиентное элюирование

Время, мин	ПФ *A*, %	ПФ *B*, %	Элюирование
0 – 5	90	10	Изократическое
5 – 15	0	100	Линейный градиент
17	0	100	Изократическое
19	90	10	Линейный градиент
35	90	10	Изократическое, уравновешивание колонки

Колонку уравновешивают смесью ПФ *A* и *B* (90:10) до достижения стабильной базовой линии. Вводят и анализируют последовательно раствор для проверки пригодности хроматографической системы, испытуемый раствор, раствор сравнения, раствор *A*. Пики раствора *A* на хроматограмме испытуемого раствора не учитывают.

На хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы разрешение (*R*) между пиками рибавирина и гуанозина должно быть не менее 10; относительное стандартное отклонение площадей пиков рибавирина и гуанозина должно быть не более 2,0 %.

На хроматограмме испытуемого раствора площадь пика каждой единичной примеси должна быть не более половины площади пика на хроматограмме раствора сравнения (0,25 %). Сумма площадей пиков всех примесей на хроматограмме испытуемого раствора должна быть не более удвоенной площади пика рибавирина на хроматограмме раствора сравнения (1,0 %).

Потеря в массе при высушивании. Не более 0,5% (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

Сульфатная зола. Не более 0,1 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

Тяжелые металлы. Не более 0,001 %. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Тяжёлые металлы» в зольном остатке, полученном после сжигания 1,0 г субстанции (ОФС «Сульфатная зола»).

Остаточные органические растворители. В соответствии с требованиями ОФС «Остаточные органические растворители».

Бактериальные эндотоксины. Не более 0,15 ЕЭ на 1 мг рибавирина (ОФС «Бактериальные эндотоксины»).

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

Количественное определение. Определение проводят методом ВЭЖХ в условиях определения родственных примесей.

Испытуемый раствор. 10,0 мл испытуемого раствора (см. раздел «Родственные примеси») помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора раствором *А* до метки, перемешивают, фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Раствор стандартного образца рибавирина. Около 0,02 г (точная навеска) стандартного образца рибавирина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в растворе *А*, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. 10,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора раствором *А* до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Раствор используют свежеприготовленным.

Режим элюирования – изократический, подвижная фаза – смесь растворов *А* и *В* (90:10).

Содержание рибавирина $C_8H_{12}N_4O_5$ в субстанции в пересчете на сухое вещество в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot P}{S_0 \cdot a}$$

где S – площадь пика рибавирина на хроматограмме испытуемого раствора 1;

S_0 – площадь пика рибавирина на хроматограмме стандартного образца рибавирина;

a – навеска субстанции, г;

a_0 – навеска стандартного образца рибавирина, г;

P – содержание рибавирина в стандартном образце, %.

Хранение. В плотно укупоренной упаковке, в защищенном от света месте.

*Контроль по показателям качества «Прозрачность раствора», «Цветность раствора» и «Бактериальные эндотоксины» проводят в субстанциях, предназначенных для производства лекарственных препаратов для парентерального применения.

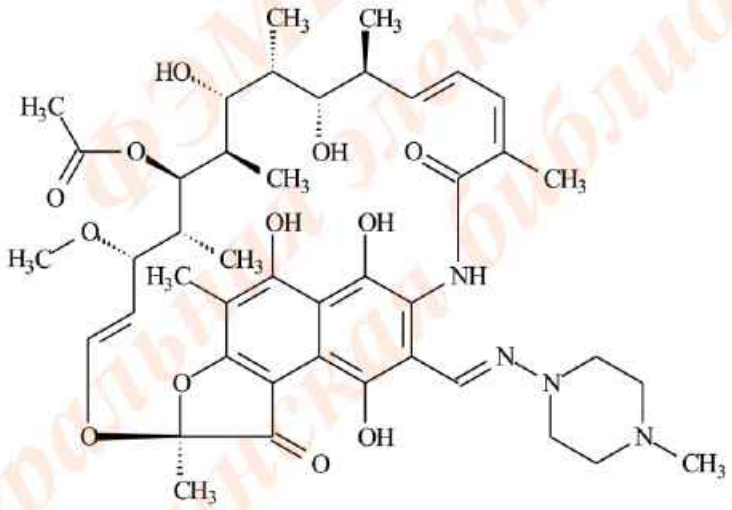
ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Рифампицин **ФС.2.1.0032.15**

Рифампицин

Rifampicinum **Взамен ФС 42-2057-92**

[(2*S*,12*Z*,14*E*,16*S*,17*S*,18*R*,19*R*,20*R*,21*S*,22*R*,23*S*,24*E*)-5,6,9,17,19-Пентагидрокси-2,4,12,16,18,20,22-гептаметил-8-[*N*-(4-метилпиперазин-1-ил)метанимидоил]-23-метокси-1,11-диоксо-1,2-дигидро-2,7-(эпоксипентадека[1,11,13]триеноимино)нафто[2,1-*b*]фуран-21-ил]ацетат



$C_{43}H_{58}N_4O_{12}$ М. м. 823,0

Рифампицин – полусинтетический антибиотик, получаемый из рифамицина SV.

Содержит не менее 97,0% и не более 102,0 % рифампицина $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$ в пересчете на сухое вещество.

ФЭМБ Федеральный электронный медицинский библиотека

Описание. Красно-коричневый или коричнево-красный кристаллический порошок.

Растворимость. Растворим в метаноле, мало растворим в ацетоне, спирте 96 % и воде.

Подлинность

1. ИК-спектр. Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области частот от 4000 до 400 $см^{-1}$ по положению полос поглощения должен соответствовать спектру стандартного образца рифампицина.

2. Спектр поглощения раствора субстанции, приготовленного для количественного определения, в области длин волн от 220 до 500 нм должен иметь максимумы поглощения при 237, 254, 334 и 475 нм. Отношение оптической плотности в максимуме поглощения при 334 нм к оптической плотности в максимуме поглощения при 475 нм должно быть около 1,75.

pH. От 4,5 до 6,5 (1 % суспензия субстанции в воде, ОФС «Ионометрия», метод 3).

Родственные примеси. Определение проводят методом ВЭЖХ.

Раствор для приготовления подвижной фазы. 1,9 г натрия перхлората растворяют в 200 мл воды, прибавляют 1 мл фосфорной кислоты концентрированной, 5,9 г лимонной кислоты, 20,9 г калия фосфата однозамещённого, доводят водой до 1000 мл и перемешивают.

Подвижная фаза. Смешивают 35 объемов ацетонитрила и 65 объемов раствора для приготовления подвижной фазы.

Смесь растворителей. К 10 объёмам 21,01 % раствора лимонной кислоты прибавляют 23 объема 13,61 % раствора калия фосфата однозамещенного, 77 объемов 17,42 % раствора калия фосфата двузамещенного, 250 объемов ацетонитрила и 640 объемов воды.

Испытуемый раствор. 20,0 мг субстанции растворяют в 10,0 мл ацетонитрила. 5,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу

вместимостью 50 мл, доводят объем раствора смесью растворителей до метки и перемешивают.

Стандартный раствор. 20,0 мг стандартного образца рифампицина хинона ([(2*S*,12*Z*,14*E*,16*S*,17*S*,18*R*,19*R*,20*R*,21*S*,22*R*,23*S*,24*E*)-5,17,19-Тригидрокси-2,4,12,16,18,20,22-гептаметил-8-[*N*-(4-метилпиперазин-1-ил)метанимидоил]-23-метокси-1,6,9,11-тетраоксо-1,2,6,9-тетрагидро-2,7-(эпоксипентадека[1,11,13]триеноимино)нафто[2,1-*b*]фуран-21-ил]ацетат) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в ацетонитриле, доводят объем раствора ацетонитрилом до метки и перемешивают. 1,0 мл полученного раствора и 1,0 мл испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора смесью растворителей до метки и перемешивают.

Хроматографические условия

Колонка	120 × 4,6 см с октадецилсиланом (С18), 5 мкм;
Скорость потока	1,5 мл/мин;
Детектор	спектрофотометрический, 254 нм;
Объем пробы	20 мкл.

Хроматографируют стандартный раствор. Разрешение (*R*) между пиками рифампицина и рифампицина хинона должно быть не менее 4,0.

Хроматографируют испытуемый раствор в течение времени, не менее чем в 2 раза превышающего время удерживания основного пика.

Площадь пика рифампицина хинона на хроматограмме испытуемого раствора не должна превышать площадь пика рифампицина хинона на хроматограмме стандартного раствора более чем в 1,5 раза (не более 1,5 %).

Площадь любого пика на хроматограмме испытуемого раствора, кроме пиков рифампицина и рифампицина хинона, не должна превышать площадь пика рифампицина на хроматограмме стандартного раствора (не более 1,0 %); сумма площадей всех пиков родственных примесей, кроме пика рифампицина хинона, должна не более, чем в 3,5 раза превышать площадь

пика рифампицина на хроматограмме стандартного раствора (не более 3,5 %).

Потеря в массе при высушивании. Не более 1,0 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании»). Около 1,0 г (точная навеска) субстанции сушат при температуре 80 °С и остаточном давлении не более 0,67 кПа в течение 4 ч.

Сульфатная зола. Не более 0,1 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют около 0,5 г (точная навеска) субстанции.

Тяжелые металлы. Не более 0,002 %. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Тяжёлые металлы» в зольном остатке, полученном после сжигания 0,5 г субстанции (ОФС «Сульфатная зола»).

Остаточные органические растворители. В соответствии с требованиями ОФС «Остаточные органические растворители».

***Аномальная токсичность.** Субстанция должна быть нетоксичной (ОФС «Аномальная токсичность»). Тест-доза – 10 мг субстанции в 0,5 мл 1 % раствора желатина на мышь, внутрь. Срок наблюдения 48 ч.

Для субстанций, предназначенных для приготовления лекарственных форм для парентерального введения, испытание проводится следующим образом.

Тест-доза – 4 мг субстанции в 0,5 мл приготовленного раствора на мышь, внутривенно. Срок наблюдения 48 ч.

Испытуемый раствор. Около 300 мг (точная навеска) субстанции помещают в стерильную ступку, растирают. 30 мг аскорбиновой кислоты и 6 мг натрия сульфита помещают в мерную колбу вместимостью 15 мл, доводят объем раствора водой для инъекций до метки и перемешивают. Полученный раствор при постоянном перемешивании прибавляют к навеске субстанции, а затем по каплям добавляют раствор натрия гидроксида 2 М (около 50 – 200 мкл) до полного растворения субстанции (pH 8 – 10). Концентрация рифампицина в полученном растворе – 20 мг в 1 мл. К 2 мл полученного раствора прибавляют 3 мл воды для

инъекций для приготовления испытуемого раствора с концентрацией рифампицина 8 мг в 1 мл.

***Бактериальные эндотоксины.** Не более 0,5 ЕЭ на 1 мг рифампицина (ОФС «Бактериальные эндотоксины»). Субстанцию растворяют в спирте этиловом 96 % при постоянном перемешивании для получения исходного раствора с концентрацией 5 мг рифампицина в 1 мл. Для проведения анализа исходный раствор разводят водой для ЛАЛ-теста не менее чем в 40 раз.

***Испытание на депрессорные вещества.** Субстанция не должна обладать депрессорным действием (ОФС «Испытание на депрессорные вещества»). Тест-доза – 2 мг субстанции в 0,5 мл приготовленного испытуемого раствора на 1 кг массы животного, внутривенно.

Испытуемый раствор. См. раздел «Аномальная токсичность» для субстанции, предназначенной для приготовления лекарственных форм для парентерального применения.

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

Количественное определение. Определение проводят спектрофотометрическим методом.

Испытуемый раствор. Около 0,1 г (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в метаноле, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают. 1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют фосфатный буферный раствор (pH 7,4), доводят объем раствора фосфатным буферным раствором (pH 7,4) до метки и перемешивают.

Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 475 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют фосфатный буферный раствор, pH 7,4.

Содержание рифампицина $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$ в субстанции в пересчете на сухое вещество в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 1 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100}{187 \cdot a \cdot (100 - W_1) \cdot 2},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

a – навеска субстанции, г;

W – потеря в массе при высушивании, %;

187 – удельный показатель поглощения рифампицина при длине волны 475 нм.

Хранение. В плотно укупоренной упаковке, в защищенном от света месте при температуре не выше 25 °С.

*Контроль по показателям качества «Аномальная токсичность», «Бактериальные эндотоксины» и «Испытание на депрессорные вещества» проводят в субстанции, предназначенной для производства лекарственных препаратов для парентерального применения.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Салициловая кислота	**ФС.2.1.0033.15**
Салициловая кислота	
Acidum salicylicum	**Взамен ГФ X, ст. 21**

2-Гидроксибензойная кислота



$C_7H_6O_3$ М. м. 138,12

Содержит не менее 99,0 % и не более 101,0 % салициловой кислоты $C_7H_6O_3$ в пересчете на сухое вещество.

Описание. Белые или бесцветные мелкие игольчатые кристаллы или легкий кристаллический порошок от белого до почти белого цвета, без запаха.

Растворимость. Легко растворим в спирте 96 %, растворим в кипящей воде, умеренно растворим в хлороформе, мало растворим в воде.

Подлинность

1. ИК-спектр. Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области частот от 4000 до 400 $см^{-1}$ по положению полос поглощения должен соответствовать спектру стандартного образца салициловой кислоты.

2. Качественная реакция. 0,01 г субстанции растворяют в 10 мл воды.

Федеральный ФЭМБ электронная медицинская библиотека

Полученный раствор должен давать характерную реакцию на салицилаты (ОФС «Общие реакции на подлинность»).

3. Качественная реакция. 1,0 г субстанции нагревают с 2 мл серной кислоты концентрированной и выделяющийся газ пропускают через раствор кальция гидроксида; должно появиться помутнение раствора.

Температура плавления. От 158 до 161 °С (ОФС «Температура плавления»).

Родственные примеси. Определение проводят методом ВЭЖХ.

Испытуемый раствор. 0,5 г субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в подвижной фазе (ПФ), доводят объём раствора ПФ до метки и перемешивают.

Раствор сравнения А. 10 мг фенола (примесь С) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в ПФ, доводят объём раствора ПФ до метки и перемешивают.

Раствор сравнения Б. 5 мг 4-гидроксибензол-1,3-дикарбоновой кислоты (примесь В) помещают в мерную колбу вместимостью 20 мл, растворяют в ПФ, доводят объём раствора ПФ до метки и перемешивают.

Раствор сравнения В. 50 мг 4-гидроксибензойной кислоты (примесь А) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в ПФ, доводят объём раствора ПФ до метки и перемешивают.

Раствор сравнения Г. 1 мл раствора сравнения *А* разбавляют ПФ до 10 мл и перемешивают.

Раствор для проверки пригодности хроматографической системы. Смесь 1 мл раствора сравнения *А*, 1 мл раствора сравнения *Б* и 1 мл раствора сравнения *В* разбавляют ПФ до 10 мл и перемешивают.

Раствор сравнения Д. 1 мл раствора для проверки пригодности хроматографической системы разбавляют ПФ до 10 мл и перемешивают.

Хроматографические условия

Колонка	15 × 0,46 см с октадецилсиланом (С18), 5 мкм;
ПФ	вода – метанол – уксусная кислота ледяная

Федеральный ЭМК
Медицинская электронная библиотека

	(60:40:1);
Скорость потока	0,5 мл/мин;
Детектор	спектрофотометрический, 270 нм;
Объем вводимой пробы	10 мкл.

Хроматографируют раствор сравнения *Г* и раствор для проверки пригодности хроматографической системы.

Относительные времена удерживания относительно фенола составляют: для 4-гидроксибензойной кислоты – около 0,70; для 4-гидроксибензол-1,3-дикарбоновой кислоты – около 0,90.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- время удерживания третьего пика на хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы соответствует времени удерживания пика фенола, полученного на хроматограмме раствора сравнения *Г*;

- на хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы разрешение (*R*) между пиками 4-гидроксибензол-1,3-дикарбоновой кислоты и фенола не менее 1,0. Для достижения необходимого разрешения возможно изменить количество уксусной кислоты ледяной в составе подвижной фазы.

Хроматографируют испытуемый раствор и раствор сравнения *Д*.

На хроматограмме испытуемого раствора площадь пика 4-гидроксибензойной кислоты должна быть не более площади соответствующего пика на хроматограмме раствора сравнения *Д* (не более 0,1 %), площадь пика 4-гидроксибензол-1,3-дикарбоновой кислоты должна быть не более площади соответствующего пика на хроматограмме раствора сравнения *Д* (не более 0,05 %), площадь пика фенола должна быть не более площади соответствующего пика на хроматограмме раствора сравнения *Д* (не более 0,02 %), площадь пика любой другой примеси должна быть не более площади

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

пика 4-гидроксиизофталевой кислоты на хроматограмме раствора сравнения *Д* (не более 0,05 %). Сумма примесей должна быть не более 0,2 %. Не учитывают пики, площадь которых составляет менее 1,0 % от площади основного пика на хроматограмме раствора сравнения *Д*.

Хлориды. Не более 0,004 % (ОФС «Хлориды»). 1,5 г субстанции растворяют в 30 мл кипящей воды, охлаждают и фильтруют. Для анализа отбирают 10 мл полученного раствора.

Сульфаты. Не более 0,02 % (ОФС «Сульфаты»). Для определения используют раствор, полученный в испытании «Хлориды».

Сульфатная зола. Не более 0,1 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют около 0,5 г (точная навеска) субстанции.

Тяжелые металлы. Не более 0,002 %. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Тяжёлые металлы» в зольном остатке, полученном после сжигания 0,5 г субстанции (ОФС «Сульфатная зола»).

Железо. Не более 0,006 % (ОФС «Железо»). Для определения используют сульфатную золу из 0,5 г субстанции.

Потеря в массе при высушивании. Не более 0,5 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Около 1,0 г субстанции (точная навеска) высушивают до постоянной массы при температуре 60 °С.

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

Количественное определение. Около 0,12 г (точная навеска) субстанции растворяют в 30 мл спирта 96 %, прибавляют 20 мл воды и титруют 0,1 М раствором натрия гидроксида (индикатор – 0,1 мл 0,1 % раствора фенолового красного) до появления красновато-фиолетовой окраски.

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида соответствует 13,81 мг салициловой кислоты $C_7H_6O_3$.

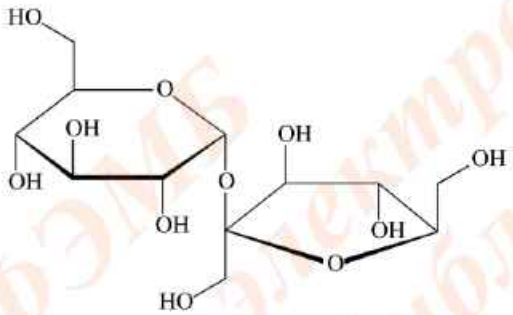
Хранение. В хорошо укупоренной упаковке, в защищённом от света

месте.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Сахароза	**ФС.2.1.0034.15**
Сахароза	
Saccharum	**Взамен ФС 42-77-72**

β-D-Фруктофуранозил-α-D-глюкопиранозид



$C_{12}H_{22}O_{11}$ М.м. 342,30

Описание. Бесцветные или белые кристаллы или белый кристаллический порошок.

Растворимость. Очень легко растворим в воде, мало растворим в спирте 96 %, практически нерастворим в хлороформе.

Подлинность.

1. ИК-спектр. Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области частот от 4000 до 400 $см^{-1}$ по положению полос поглощения должен соответствовать спектру стандартного образца сахарозы.

2. Тонкослойная хроматография

Раствор борной кислоты. К 3 г борной кислоты прибавляют 50 мл воды, перемешивают в течение 10 мин и оставляют в холодильнике на 2 ч. Раствор используют свежеприготовленным.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Раствор уксусной кислоты. 60 мл уксусной кислоты ледяной помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Раствор тимола. К 0,5 г тимола прибавляют смесь 5 мл серной кислоты концентрированной и 95 мл спирта 96 %.

Испытуемый раствор. 0,005 г субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в 5 мл смеси вода – метанол (2:3), доводят объем раствора той же смесью до метки и перемешивают.

Раствор сравнения. 0,005 г стандартного образца сахарозы помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в 5 мл смеси вода – метанол (2:3), доводят объем раствора той же смесью до метки и перемешивают.

Раствор для проверки пригодности хроматографической системы. По 0,005 г стандартных образцов фруктозы, глюкозы, лактозы и сахарозы помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в 5 мл смеси вода – метанол (2:3), доводят объем раствора той же смесью до метки и перемешивают.

На линию старта пластинки со слоем силикагеля G наносят по 2 мкл испытуемого раствора, раствора сравнения и раствора для проверки пригодности хроматографической системы. Пластинку с нанесенными пробами помещают в камеру со смесью раствор борной кислоты охлажденный – раствор уксусной кислоты ледяной – спирт 96 % – ацетон – этилацетат (10:15:20:60:60) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, её вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, опрыскивают раствором тимола, нагревают в сушильном шкафу при температуре 130 °С в течение 10 мин.

На хроматограмме испытуемого раствора должно обнаруживаться пятно на уровне пятна на хроматограмме раствора стандартного образца сахарозы.

Результаты испытания считаются достоверными, если на

хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы наблюдается четкое разделение 4 пятен.

3. Качественная реакция. 0,5 г субстанции растворяют в 1 мл воды, прибавляют 1 мл 5 % раствора кобальта нитрата и 2 мл 10 % раствора натрия гидроксида; должно появиться фиолетовое окрашивание.

Удельное вращение. От +66,3 до +67,0° в пересчете на сухое вещество (26 % раствор в воде, ОФС «Поляриметрия»).

Инвертированный сахар и другие восстанавливающие вещества. 1 г субстанции растворяют в 5 мл воды, прибавляют 5 мл медно-тартратного реактива и нагревают до кипения. Желтый или красный осадок не должен выпадать сразу.

Хлориды. ОФС «Хлориды». 2 г субстанции растворяют в 10 мл воды. Не должно быть опалесценции.

Сульфаты. ОФС «Сульфаты». 2 г субстанции растворяют в 10 мл воды. Не должно быть опалесценции.

Кальций. ОФС «Кальций». 2 г субстанции растворяют в 10 мл воды. Не должно быть опалесценции.

Барий, стронций. 2 г субстанции растворяют в 10 мл воды, прибавляют 1 мл серной кислоты разведенной 16 %. Полученный раствор должен быть прозрачным в течение 10 мин.

Потеря в массе при высушивании. Не более 0,1% (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Для определения используют около 2,0 г (точная навеска) субстанции.

Сульфатная зола. Не более 0,1 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют около 0,5 г (точная навеска) субстанции.

Тяжелые металлы. Не более 0,0005 % (ОФС «Тяжёлые металлы»). 2 г субстанции растворяют в 10 мл воды.

Вещества, осаждаемые спиртом. 4 г субстанции растворяют в 6 мл воды. К 2 мл полученного раствора прибавляют 5 мл спирта 96 %. Раствор должен быть прозрачным.

Федеральная электронная медицинская библиотека ГБУЗ

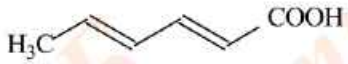
Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Хранение. В хорошо укупоренной упаковке.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Сорбиновая кислота	**ФС.2.1.0035.15**
Сорбиновая кислота	
Acidum sorbicum	**Вводится впервые**

(2*E*,4*E*)-Гекса-2,4-диеновая кислота



$C_6H_8O_2$ М. м. 112,13

Содержит не менее 99,0 % и не более 101,0 % сорбиновой кислоты $C_6H_8O_2$ в пересчете на безводное вещество.

Описание. Белый или почти белый кристаллический порошок.

Растворимость. Легко растворим в спирте 96 %, мало растворим в воде.

Подлинность

1. *ИК-спектр.* Инфракрасный спектр поглощения субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области частот от 4000 до 400 $см^{-1}$ по положению полос поглощения должен соответствовать рисунку спектра сорбиновой кислоты (Приложение).

2. *УФ-спектр.* 0,05 г субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 2,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 200 мл, доводят объем раствора 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты до метки и перемешивают. Ультрафиолетовый

ФГБУ «ВЭМБ» Медицинская электронная библиотека

спектр поглощения полученного раствора в области длин волн от 230 до 350 нм должен иметь максимум при длине волны 264 нм.

3. Качественная реакция. К 1 мл 5 % раствора субстанции прибавляют 2 мл 0,1 М раствора йода; раствор должен обесцветиться.

Температура плавления. От 132 до 136 °С (ОФС «Температура плавления»).

Прозрачность раствора. Раствор 1,25 г субстанции в 25 мл спирта 96 % должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

Альдегиды. Не более 0,15 % в пересчете на ацетальдегид.

Испытуемый раствор. 1,0 г субстанции растворяют в 80 мл смеси, состоящей из 30 мл воды и 50 мл 2-пропанола, доводят pH раствора до 4,0 прибавлением 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты или 0,1 М раствора натрия гидроксида. Объем полученного раствора доводят водой до 100 мл и перемешивают.

Стандартный раствор ацетальдегида (100 мкг/мл). 1,0 г ацетальдегида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 2-пропаноле, доводят объем полученного раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. 5,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 500 мл, доводят объем раствора 2-пропанолом до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Эталонный раствор. К 1,5 мл стандартного раствора ацетальдегида (100 мкг/мл) прибавляют 4 мл 2-пропанола и 4,5 мл воды.

К 10 мл испытуемого раствора и эталонного раствора прибавляют по 1 мл 0,1 % обесцвеченного раствора фуксина. Через 30 мин окраска испытуемого раствора должна быть не интенсивнее окраски эталонного раствора.

Вода. Не более 1,0 % (ОФС «Определение воды»). Для определения используют около 2,0 г (точная навеска) субстанции.

Сульфатная зола. Не более 0,2 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для

определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

Тяжелые металлы. Не более 0,001 %.

Испытуемый раствор. 12 мл раствора, приготовленного в испытании на «Прозрачность раствора».

Стандартный раствор 1 мкг/мл свинец-иона. 1,0 мл стандартного раствора свинец-иона (100 мкг/мл) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Эталонный раствор. К 5 мл стандартного раствора свинец-иона (1 мкг/мл) прибавляют 5 мл спирта 96 % и 2 мл раствора, приготовленного в испытании на «Прозрачность раствора».

Контрольный раствор. К 10 мл спирта 96 % прибавляют 2 мл раствора, приготовленного в испытании на «Прозрачность раствора».

К испытуемому, эталонному и контрольному растворам прибавляют по 2 мл буферного раствора, pH 3,5, перемешивают, прибавляют по 1,2 мл реактива тиоацетамида и немедленно перемешивают. Через 2 мин сравнивают окраску растворов. Окраска испытуемого раствора не должна превышать окраску эталонного раствора.

Остаточные органические растворители. В соответствии с требованиями ОФС «Остаточные органические растворители».

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

Количественное определение. Около 0,1 г (точная навеска) субстанции растворяют в 20 мл спирта 96 % и титруют полученный раствор 0,1 М раствором натрия гидроксида до появления розового окрашивания (индикатор – 0,2 мл 0,1 % раствора фенолфталеина) или определяют точку эквивалентности потенциометрически.

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида соответствует 11,21 мг сорбиновой кислоты $C_6H_8O_2$.

Республиканская нормативная электронная библиотека

Хранение. В плотно укупоренной упаковке, в защищенном от света месте.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Спирт этиловый 95%, 96 %	**ФС.2.1.0036.15**
Этанол	**Взамен ВФС 42-2761-96;**
Ethanolum	**взамен ФС 42-3072-00**

Этанол



C_2H_6O М. м. 46,07

Спирт этиловый 95% содержит от 94,9 % до 96,0% этанола C_2H_6O (о/о), от 92,3% до 93,8% (м/м); спирт этиловый 96% содержит от 95,1% до 96,9% этанола (о/о), от 92,6% до 95,2% (м/м).

Настоящая фармакопейная статья распространяется на спирт этиловый 95% и спирт этиловый 96 %, вырабатываемый из различных видов сахар- и крахмалосодержащего пищевого сырья и применяемый для производства/изготовления стерильных и нестерильных лекарственных форм.

Описание. Прозрачная бесцветная подвижная жидкость с характерным спиртовым запахом.

Растворимость. Смешивается с водой, хлороформом, ацетоном и глицерином во всех отношениях.

Подлинность

1. Качественная реакция. 2 мл субстанции смешивают с 0,5 мл уксусной кислоты ледяной и 1 мл серной кислоты концентрированной и нагревают до кипения; должен появиться характерный запах этилацетата.

Федеральный ЭМБ
медицинская библиотека

2. Качественная реакция. 0,5 мл субстанции смешивают с 5 мл 10 % раствора натрия гидроксида, прибавляют 2 мл 0,05 М раствора йода; должен появиться запах йодоформа и постепенно образоваться желтый осадок.

Плотность. Спирт этиловый 95%: от 0,808 до 0,812 г/см^3 (при 20 °С, ОФС «Плотность).

Спирт этиловый 96%: от 0,804 до 0,811 г/см^3 (при 20 °С, ОФС «Плотность»).

Прозрачность. Смесь равных объемов субстанции и воды должна быть прозрачной (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

Цветность. Субстанция должна быть бесцветной (ОФС «Степень окраски жидкостей», метод 2).

Кислотность или щелочность. К 20 мл субстанции прибавляют 25 мл свежепрокипяченной и охлажденной воды и 0,1 мл 1 % раствора фенолфталеина. Раствор остается бесцветным и окрашивается в розовый цвет, устойчивый в течение 30 с, при прибавлении не более 0,2 мл 0,05 М раствора натрия гидроксида.

Хлориды. Не более 0,001 % (ОФС «Хлориды»). 6 мл субстанции разбавляют водой до 30 мл.

Сульфаты. Не более 0,005 % (ОФС «Сульфаты»). Для определения используют раствор, приготовленный в испытании «Хлориды».

Тяжелые металлы. Не более 0,0005 % (ОФС «Тяжёлые металлы»). Для определения используют раствор, приготовленный в испытании «Хлориды».

Метанол. Не более 0,02 % (о/о) в пересчете на спирт этиловый безводный.

Определение проводят методом газовой хроматографии (ГХ).

Хроматографические условия

Колонка	капиллярная HP-FFAP длиной 50 м, диаметром 0,32 мм с толщиной слоя неподвижной фазы 0,52 мкм или аналогичная;

ГБОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия» Электронная библиотека

Детектор	пламенно-ионизационный;
Газ-носитель	азот ос. ч.;
Линейная скорость	20 см/с;
Расход водорода	20 мл/мин;
Расход воздуха	200 мл/мин;
Деление потока	1:30;
Объем пробы	1 мкл;
Время анализа	20 мин.

Температура		
	Время, мин	Температура, °С
Колонка	0 – 7 7 – 16 16 – 20	70 – 75 70 → 180 (12 °С/ мин) 180
Испаритель		150
Детектор		200

Хроматографируют градуировочную смесь (РС-3 МСО 1748:2011 «Стандартные образцы состава растворов токсичных микропримесей в этиловом спирте» или аналогичный) и субстанцию.

Допускается корректировка условий хроматографирования при условии пригодности хроматографической системы.

Порядок выхода пиков на хроматограмме: ацетальдегид, метилацетат, этилацетат, метанол, 2-пропанол, этанол, пропанол, изобутиловый спирт, бутанол, изоамиловый спирт.

Хроматографическая система считается пригодной, если разрешение (R) между пиками метанола и этилацетата не менее 1,0; относительные стандартные отклонения результатов отдельных измерений времен удерживания и площадей пиков каждого компонента не превышают 2 %.

Содержание метанола в субстанции (X) в процентах (о/о) в пересчете на спирт этиловый безводный рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{S \cdot C_0 \cdot 100}{S_0 \cdot P}$$

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

где C_0 – концентрация метанола в градуировочной смеси, % (о/о);

S_0 – площадь пика метанола на хроматограмме градуировочной смеси;

S – площадь пика метанола на хроматограмме субстанции;

P – содержание спирта этилового в субстанции, % (о/о), рассчитанное по плотности субстанции.

Альдегиды. Не более 0,00025 % (о/о) (не более 2 мг/л) в пересчете на спирт этиловый безводный.

Определение проводят методом ГХ. Условия хроматографирования приведены в разделе "Метанол".

Содержание альдегидов (ацетальдегида) в субстанции (X) в процентах (о/о) в пересчете на спирт этиловый безводный рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{S \cdot C}{S_0 \cdot P \cdot \rho \cdot 100}$$

где S – площадь пика ацетальдегида на хроматограмме субстанции;

S_0 – площадь пика ацетальдегида на хроматограмме градуировочной смеси;

C – концентрация ацетальдегида в градуировочной смеси, мг/л;

ρ – плотность ацетальдегида, равная 0,783 г/мл;

P – содержание спирта этилового в субстанции, % (о/о), рассчитанное по плотности субстанции.

Сложные эфиры. Не более 0,0011 % (о/о, не более 10 мг/л) в пересчете на спирт этиловый безводный.

Определение проводят методом ГХ. Условия хроматографирования приведены в разделе "Метанол".

Содержание сложных эфиров (метилацетат, этилацетат) в субстанции (X) в процентах (о/о) в пересчете на спирт этиловый безводный рассчитывают по формуле:

$$X = \sum X_i ,$$

где X_i – концентрация каждого из сложных эфиров, рассчитанная по формуле:

$$X_i = \frac{S_i \cdot C_i}{S_0 \cdot P \cdot \rho_i \cdot 100}$$

где S_i – площадь пика каждого сложного эфира (метилацетат, этилацетат) на хроматограмме субстанции;

S_0 – площадь пика каждого сложного эфира (метилацетат, этилацетат) на хроматограмме градуировочной смеси;

C_i – концентрация каждого сложного эфира (метилацетат, этилацетат) в градуировочной смеси, мг/л;

ρ_i – плотность каждого сложного эфира, равная 0,924 г/мл для метилацетата и 0,901 г/мл для этилацетата соответственно;

P – содержание спирта этилового в субстанции, % (о/о), рассчитанное по плотности субстанции.

Сивушное масло. Не более 0,0006 % (о/о) (не более 5 мг/л) в пересчете на спирт этиловый безводный.

Определение проводят методом ГХ. Условия хроматографирования приведены в разделе "Метанол".

Содержание сивушного масла (пропанол, 2-пропанол, изобутиловый спирт, бутанол, изоамиловый спирт) в субстанции (X) в процентах (о/о) в пересчете на спирт этиловый безводный рассчитывают по формуле:

$$X = \sum X_i ,$$

где X_I – концентрация каждого компонента сивушного масла, рассчитанная по формуле:

$$X_i = \frac{S_i \cdot C_i}{S_0 \cdot P \cdot \rho_i \cdot 100}$$

где: S_i – площадь пика каждого компонента сивушного масла (пропанол, 2-пропанол, изобутиловый спирт, бутанол, изоамиловый спирт) на хроматограмме субстанции;

S_0 – площадь пика каждого компонента сивушного масла (пропанол, 2-пропанол, изобутиловый спирт, бутанол, изоамиловый спирт) на хроматограмме градуировочной смеси;

C_i – концентрация каждого компонента сивушного масла (пропанол, 2-пропанол, изобутиловый спирт, бутанол, изоамиловый спирт) в градуировочной смеси, мг/л;

ρ_i – плотность каждого компонента сивушного масла, равная 0,804 г/мл для пропанола, 0,785 г/мл для 2-пропанола, 0,803 г/мл

для изобутилового спирта, 0,810 г/мл для бутанола и 0,812 г/мл для изоамилового спирта соответственно;

P – содержание спирта этилового в субстанции, % (о/о), рассчитанное по плотности субстанции.

Фурфурол. В градуированный цилиндр с притертой пробкой помещают 10 мл субстанции, прибавляют 0,5 мл свежеперегнанного анилина, 2 мл ледяной уксусной кислоты, закрывают пробкой и перемешивают. Через 20 мин смесь должна оставаться бесцветной.

Восстанавливающие вещества

Раствор кобальта хлорида. 2,5 г кобальта хлорида помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в воде, приливают 0,1 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Раствор калия дихромата. 0,100 г растертого калия дихромата, предварительно высушенного до постоянной массы при температуре 100 – 105 °С, растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 500 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Эталонный раствор. 5 мл раствора кобальта хлорида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 7 мл раствора калия дихромата, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

0,02 % раствор калия перманганата. 0,02 г калия перманганата растворяют в 100 мл воды.

50 мл субстанции помещают в предварительно ополоснутый испытуемым спиртом цилиндр с притертой пробкой и погружают на 10 мин в водяную баню с температурой 15 °С таким образом, чтобы уровень воды в бане был выше уровня спирта в цилиндре. Прибавляют 1 мл 0,02 % раствора калия перманганата, закрывают цилиндр пробкой, перемешивают и вновь погружают в баню. При стоянии красно-фиолетовая окраска смеси постепенно изменяется и не должна достигнуть окраски эталонного раствора в течение 20 мин.

Федеральный электронный медицинский библиотека ФЭМБ

Нелетучие вещества. Не более 0,01 %. 100 мл субстанции выпаривают досуха на водяной бане и сушат при температуре 100 – 105 °С до постоянной массы; остаток не должен превышать 1 мг. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Остаточные органические растворители».

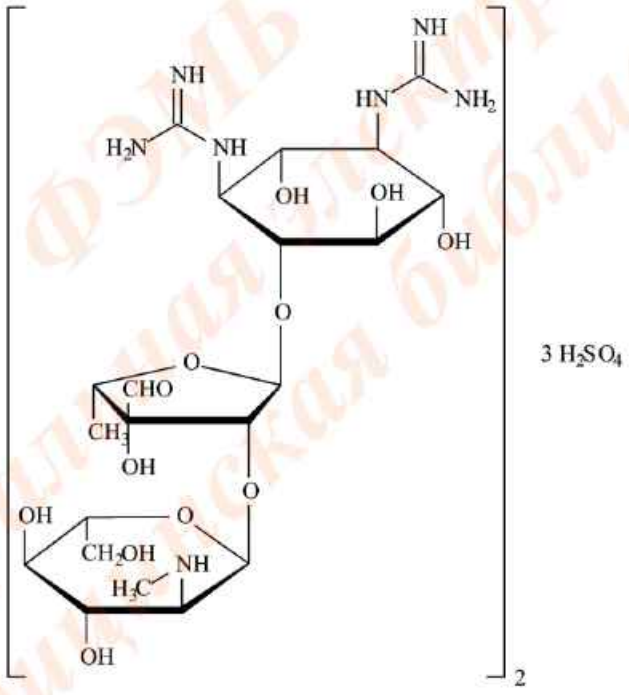
Микробиологическая чистота. В соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

Хранение. В плотно укупоренной упаковке, вдали от огня.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Стрептомицина сульфат	**ФС.2.1.0037.15**
Стрептомицина сульфат	**Взамен ГФ X, ст. 636;**
Streptomycini sulfas	**взамен ФС 42-3726-99**

N,N'-Бис(аминоиминометил)-[*O*-2-дезокси-2-(метиламино)-α-*L*-глюкопиранозил-(1→2)-*O*-5-дезокси-3-*C*-формил-α-*L*-ликсофуранозил-(1→4)-*D*-стрептамина сульфат (2:3)



$(C_{21}H_{39}N_7O_{12})_2 \cdot 3H_2SO_4$ М. м. 1457,4

Стрептомицин образуется несколькими штаммами *Streptomyces griseus*. 1 мкг химически чистого стрептомицина основания соответствует специфической активности, равной одной единице действия (ЕД).

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

Содержит не менее 730 мкг/мг активного вещества в пересчете на сухое вещество.

Описание. Белый или почти белый порошок, гигроскопичен.

Растворимость. Очень легко растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 %.

Подлинность

1. Тонкослойная хроматография

Испытуемый раствор. 0,01 г субстанции растворяют в 10 мл воды.

Раствор сравнения (А). 0,01 г стандартного образца стрептомицина сульфата растворяют в 10 мл воды.

Раствор сравнения (Б). 0,01 г стандартного образца стрептомицина сульфата, 0,01 г стандартного образца канамицина моносульфата и 0,01 г стандартного образца неомицина сульфата растворяют в 10 мл воды.

Раствор нафталин-1,3-диола. 0,2 г нафталин-1,3-диола с содержанием основного вещества не менее 98 % помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в спирте 96 %, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают.

Раствор серной кислоты. 600 мл воды помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, осторожно по стенке при постоянном перемешивании и охлаждении прибавляют 255 мл серной кислоты концентрированной, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Раствор 1,3-дигидроксинафталина в растворе серной кислоты.

Смешивают равные объемы раствора нафталин-1,3-диола и раствора серной кислоты.

На линию старта пластинки со слоем силикагеля 60 F размером 10 см × 15 см наносят по 10 мкл испытуемого раствора, раствора сравнения (*А*), раствора сравнения (*Б*) и хроматографируют в 0,5 М растворе калия фосфата однозамещенного. Когда подвижная фаза пройдет ¾ длины

пластинки, ее вынимают из камеры, сушат в токе холодного воздуха, опрыскивают раствором нафталин-1,3-диола в растворе серной кислоты и выдерживают при температуре 150 °С в течение 5 – 10 мин.

Основное пятно на хроматограмме испытуемого раствора должно находиться на уровне пятна на хроматограмме раствора сравнения (*А*).

Результаты анализа считаются достоверными, если на хроматограмме раствора сравнения (*Б*) четко обнаруживаются 3 пятна.

2. Качественная реакция. 8 мг субстанции растворяют в 4 мл воды, прибавляют 1 мл 1 М раствора натрия гидроксида. Нагревают на водяной бане в течение 4 мин. Полученный раствор нейтрализуют 2 М раствором хлористоводородной кислоты и прибавляют 0,1 мл 1 % раствора железа(III) хлорида; раствор должен окраситься в фиолетовый цвет.

3. Качественная реакция. 0,1 г субстанции растворяют в 2 мл воды, прибавляют 1 мл 0,1 % раствора α-нафтола и 2 мл 1,5 % раствора натрия гипохлорита; наблюдается красное окрашивание.

4. Качественная реакция. Субстанция дает характерную реакцию на сульфаты (ОФС «Общие реакции на подлинность»).

pH. От 4,5 до 7,0 (25 % раствор, ОФС «Ионометрия», метод 3).

Стрептомицин В. Испытание проводят методом тонкослойной хроматографии (ТСХ).

Испытуемый раствор. Около 0,2 г субстанции помещают в колбу для перегонки вместимостью 50 мл, растворяют при энергичном перемешивании в 5 мл свежеприготовленной смеси 3 объемов серной кислоты концентрированной и 97 объемов метанола. Содержимое колбы кипятят с обратным холодильником в течение 1 ч, охлаждают, промывают холодильник 10 мл метанола, собирая смывы в колбу с раствором, и доводят объём полученного раствора метанолом до 20 мл.

Стандартный раствор. Около 0,036 г маннозы помещают в колбу для перегонки вместимостью 50 мл, растворяют при энергичном перемешивании в 5 мл свежеприготовленной смеси 3 объемов серной кислоты

концентрированной и 97 объемов метанола. Содержимое колбы кипятят с обратным холодильником в течение 1 ч, охлаждают, промывают холодильник 10 мл метанола, переносят количественно полученный раствор в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем метанолом до метки и перемешивают. 5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают.

Полученный раствор содержит эквивалент 0,03 % раствора стрептомицина В (1 мг *D*-маннозы соответствует 4,13 мг стрептомицина В).

Раствор для проверки пригодности хроматографической системы. Смешивают по 1 мл испытуемого и стандартного растворов.

На линию старта пластинки со слоем силикагеля 60 F наносят по 10 мкл испытуемого и стандартного растворов и раствора для проверки пригодности хроматографической системы, хроматографируют восходящим способом в смеси растворителей уксусная кислота ледяная – метанол – толуол (1:1:2), предварительно насыщая камеру парами растворителей в течение не менее 12 ч.

Когда фронт подвижной фазы пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и опрыскивают свежеприготовленной смесью равных объемов 0,2 % раствора нафталина-1,3-диола в спирте 96 % и 20 % раствора серной кислоты. Пластинку выдерживают при температуре 110 °С в течение 5 мин.

Пятно, соответствующее стрептомицину В на хроматограмме испытуемого раствора, не должно по величине и интенсивности окраски превышать пятно, полученное на хроматограмме стандартного раствора (не более 3 %).

Результаты испытания считаются достоверными, если на хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы видны 2 чётко разделённых пятна.

Фармакопейная электронная библиотека

Потеря в массе при высушивании. Не более 5,0 %. Около 1,0 г (точная навеска) субстанции сушат в вакуум-сушильном шкафу при температуре 60 °С и остаточном давлении, не превышающем 0,7 кПа (5 мм рт. ст.) в течение 3 ч.

Сульфатная зола. Не более 1,0 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

Сульфаты. От 18,0 до 21,5 % в пересчете на сухое вещество.

Около 0,25 г (точная навеска) субстанции растворяют в 100 мл воды при тщательном перемешивании, pH полученного раствора доводят до 11 (потенциометрически) 13,5 М раствором аммиака. К полученному раствору прибавляют 10 мл 0,1 М раствора бария хлорида и около 0,5 мг индикатора фталеинового пурпурного. Избыток 0,1 М раствора бария хлорида титруют 0,1 М раствором натрия эдетата до начала изменения окраски, прибавляют 50 мл спирта 96 % и продолжают титрование до исчезновения фиолетово-голубого окрашивания раствора.

1 мл 0,1 М раствора бария хлорида соответствует 9,606 мг сульфат-ионов.

Колориметрический тест. *1,5 % раствор железа(III) хлорида в 0,5 М растворе серной кислоты*. 15 г железа(III) хлорида растворяют в 250 мл 0,5 М раствора серной кислоты, доводят объем раствора водой до 1000 мл и перемешивают.

Испытуемый раствор. Субстанцию сушат в вакуум-сушильном шкафу при температуре 60 °С и остаточном давлении, не превышающем 0,7 кПа (5 мм рт. ст.) в течение 3 ч. 0,1 г высушенной субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Раствор стандартного образца. 0,1 г стандартного образца стрептомицина сульфата, высушенного, как указано для испытуемого раствора, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Федеральная электронная медицинская библиотека

Раствор сравнения. К 5 мл воды прибавляют 5 мл 0,2 М раствора натрия гидроксида и нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 мин. Затем колбу помещают на 5 мин в баню со льдом, прибавляют 3 мл 1,5 % раствора железа(III) хлорида в 0,5 М растворе серной кислоты, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

По 5 мл испытуемого и стандартного растворов помещают в мерные колбы вместимостью 25 мл. В каждую колбу прибавляют по 5 мл 0,2 М раствора натрия гидроксида и нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 мин. Затем колбу помещают на 5 мин в баню со льдом, прибавляют 3 мл 1,5 % раствора железа(III) хлорида в 0,5 М растворе серной кислоты, доводят объемы растворов водой до метки и перемешивают. Через 20 мин измеряют оптическую плотность испытуемого и стандартного растворов в кювете с толщиной слоя 10 мм в максимуме поглощения при длине волны 525 нм относительно раствора сравнения.

Величина оптической плотности испытуемого раствора должна составлять не менее 90,0 % от величины оптической плотности стандартного раствора.

Остаточные органические растворители. В соответствии с требованиями ОФС «Остаточные органические растворители».

***Аномальная токсичность.** Субстанция должна быть нетоксичной (ОФС «Аномальная токсичность»).

***Бактериальные эндотоксины**. Не более 0,25 ЕЭ на 1 мг стрептомицина (ОФС «Бактериальные эндотоксины»).

***Стерильность.** В соответствии с требованиями ОФС «Стерильность».

Тест-доза: 1,3 мг субстанции в 0,5 мл воды для инъекций на мышь. Срок наблюдения 48 ч.

Количественное определение. Проводят определение в соответствии с ОФС «Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар».

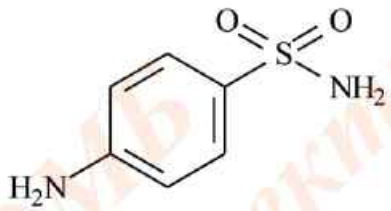
Хранение. В плотно укупоренной упаковке, в защищенном от света месте.

*Контроль по показателям качества «Аномальная токсичность», «Бактериальные эндотоксины» и «Стерильность» проводят в субстанции, предназначенной для производства лекарственных препаратов для парентерального применения.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Сульфаниламид	**ФС.2.1.0038.15**
Стрептоцид белый	**Взамен ГФ X, ст. 633;**
Sulfanilamidum	**взамен ФС 42-2744-98**

4-Аминобензолсульфонамид



$C_6H_8N_2O_2S$ М.м. 172,20

Содержит не менее 99,0 % сульфаниламида $C_6H_8N_2O_2S$ в пересчете на сухое вещество.

Описание. Белый или желтовато-белый кристаллический порошок.

Растворимость. Легко растворим в ацетоне, хлористоводородной кислоте разведенной 8,3 %, умеренно растворим в спирте 96 %, мало растворим в воде.

Подлинность

1. ИК-спектр. Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области частот от 4000 до 400 $см^{-1}$ по положению полос поглощения должен соответствовать рисунку спектра сульфаниламида (Приложение).

2. УФ-спектр. Ультрафиолетовый спектр поглощения 0,0008 % раствора субстанции в 0,01 М растворе натрия гидроксида в области длин

Федеральная ФЭМБ электронная медицинская библиотека

волн от 220 до 330 нм должен иметь максимум поглощения при 251 нм.

3. УФ-спектр. Ультрафиолетовый спектр поглощения 0,015 % раствора субстанции в 1 М растворе хлористоводородной кислоты в области длин волн от 220 до 320 нм должен иметь максимумы поглощения при 264 нм, 271 нм, минимумы поглощения при 241 нм, 268 нм и плечо в области от 257 до 261 нм.

4. Качественная реакция. 0,05 г субстанции должны давать характерную реакцию на первичные ароматические амины (ОФС «Общие реакции на подлинность»).

Температура плавления. От 164 до 167 °С (ОФС «Температура плавления»).

Кислотность. 0,8 г субстанции растворяют в 40 мл свежепрокипяченной и охлаждённой воды при нагревании на водяной бане, быстро охлаждают и фильтруют. К 25 мл фильтрата прибавляют 0,1 мл 0,1 % спиртового раствора бромтимолового синего; появившееся желтое окрашивание должно перейти в голубое от прибавления не более 0,05 мл 0,05 М раствора натрия гидроксида.

Органические примеси. 0,3 г субстанции растворяют при встряхивании в 5 мл серной кислоты концентрированной. Окраска полученного раствора должна быть не интенсивнее окраски эталона Y_6 (ОФС «Степень окраски жидкостей»).

Родственные примеси. Определение проводят методом тонкослойной хроматографии (ТСХ).

Испытуемый раствор. 0,1 г субстанции растворяют в 10 мл смеси спирт 96 % – аммиака раствор концентрированный 25 % (9:1).

Раствор сравнения. 0,25 мл испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора смесью спирт 96 % – аммиака раствор концентрированный 25 % (9:1) до метки и перемешивают.

Срок годности раствора 7 сут.

Раствор стандартного образца сульфаниловой кислоты. 0,1 г

сульфаниловой кислоты (4-аминобензолсульфоновая кислота) растворяют в 70 мл смеси спирт 96 % – аммиака раствор концентрированный 25 % (9:1) в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем раствора той же смесью растворителей до метки и перемешивают.

Срок годности раствора 7 сут.

0,5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора смесью спирт 96 % – раствор аммиака концентрированный 25 % (9:1) до метки и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

На линию старта пластинки (предварительно промытой ацетоном) со слоем силикагеля 60 F_{254} в точку А наносят 0,01 мл испытуемого раствора (100 мкг сульфаниламида), рядом в точку Б наносят 0,01 мл раствора сравнения (0,5 мкг сульфаниламида), а в точку В наносят по 0,01 мл испытуемого раствора и раствора стандартного образца сульфаниловой кислоты (100 мкг сульфаниламида и 0,5 мкг сульфаниловой кислоты).

Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе в течение 10 мин, помещают в камеру со смесью растворителей аммиака раствор концентрированный 25 % – метанол – хлороформ (3:9:16) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт подвижной фазы пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм.

На хроматограмме А (испытуемый раствор), кроме основного пятна, допускается наличие одного дополнительного пятна, которое по величине и интенсивности поглощения не должно превышать пятна на хроматограмме Б (не более 0,5 %).

Результаты анализа считаются достоверными, если на хроматограмме В наблюдаются 2 четких отдельных пятна.

Хлориды. Не более 0,02 % (ОФС «Хлориды»). 1,0 г субстанции встряхивают с 20 мл воды в течение 1 мин и фильтруют. 2 мл фильтрата

разбавляют водой до 10 мл.

Сульфаты. Не более 0,02 % (ОФС «Сульфаты», метод 1). Для анализа отбирают 10 мл фильтрата, полученного в испытании «Хлориды».

Примечание. Разделы «Хлориды» и «Сульфаты» вводят при необходимости в зависимости от способа получения.

Потеря в массе при высушивании. Не более 0,5 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Для определения используют около 0,5 г (точная навеска) субстанции.

Сульфатная зола. Не более 0,1 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

Тяжелые металлы. Не более 0,001 %. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Тяжёлые металлы» в зольном остатке, полученном после сжигания 1,0 г субстанции (ОФС «Сульфатная зола»).

Остаточные органические растворители. В соответствии с требованиями ОФС «Остаточные органические растворители».

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

Количественное определение. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Нитритометрия» с использованием около 0,25 г (точная навеска) субстанции.

При визуальной индикации конечной точки титрования в качестве внутреннего индикатора используют тропеолин 00 в смеси с метиленовым синим.

Параллельно проводят контрольный опыт.

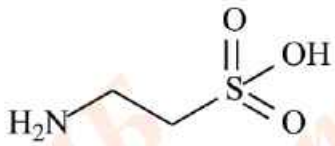
1 мл 0,1 М раствора натрия нитрита соответствует 17,22 мг сульфаниламида $C_6H_8N_2O_2S$.

Хранение. В защищенном от света месте.

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

Таурин	**ФС.2.1.0039.15**
Таурин	
Taurinum	**Взамен ФС 42-3036-94**

2-Аминоэтансульфоновая кислота



$C_2H_7NO_3S$ М. м. 125,15

Содержит не менее 99,0 % таурина $C_2H_7NO_3S$ в пересчете на сухое вещество.

Описание. Белый кристаллический порошок или бесцветные кристаллы.

Растворимость. Растворим в воде и 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты, практически нерастворим в спирте 96 % и хлороформе.

Подлинность

1. ИК-спектр. Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области от 4000 до 400 $см^{-1}$ по положению полос поглощения должен соответствовать спектру стандартного образца таурина.

2. Качественная реакция. 0,05 г субстанции растворяют в 10 мл воды. К полученному раствору прибавляют 1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида и 0,06 мл 1 % раствора фенолфталеина; должно появиться малиновое окрашивание, исчезающее при прибавлении к раствору 1 мл раствора формальдегида, предварительно нейтрализованного по фенолфталеину.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

3. Качественная реакция. 0,05 г субстанции помещают в тигель, растворяют в 1 мл окислительной смеси, содержащей 0,5 г калия нитрата в 25 мл азотной кислоты концентрированной, и озоляют сначала на электрической плитке до прекращения выделения паров, затем в муфельной печи при 600 °С до получения белого остатка. К остатку прибавляют 2 мл воды. Содержимое тигля переносят в пробирку, к полученному раствору прибавляют 0,5 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 % и 0,5 мл 5 % раствора бария хлорида; должен образоваться белый осадок, нерастворимый в разведенных минеральных кислотах.

***Прозрачность раствора**. Раствор 0,4 г субстанции в 10 мл воды должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

***Цветность раствора.** Раствор, полученный в испытании на «Прозрачность раствора», должен быть бесцветным (ОФС «Степень окраски жидкостей»).

pH. От 4,8 до 6,0 (4 % раствор, ОФС «Ионометрия», метод 3).

Родственные примеси. Определение проводят методом тонкослойной хроматографии (ТСХ).

Испытуемый раствор А. 0,4 г субстанции растворяют в 100 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты.

Испытуемый раствор Б. 50 мл раствора *А* помещают в колбу вместимостью 100 мл, кипятят с обратным холодильником в течение 3 ч и охлаждают до комнатной температуры.

Растворы сравнения. 0,04 г 2-аминоэтанола растворяют в 100 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты.

2,0 мл, 1,0 мл и 0,5 мл полученного раствора разбавляют до 100 мл 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты (растворы сравнения *1, 2 и 3* соответственно).

На линию старта пластинки со слоем силикагеля 60 F наносят 10 мкл (40 мкг) испытуемого раствора *А*, 10 мкл (0,04 мкг) раствора сравнения *2*,

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

10 мкл (0,02 мкг) раствора сравнения *3*, 10 мкл (40 мкг) испытуемого раствора *Б*, 10 мкл (0,08 мкг) раствора сравнения *1*. Для проверки пригодности хроматографической системы в одну точку наносят 10 мкл (40 мкг) испытуемого раствора *А* и 10 мкл (0,08 мкг) раствора сравнения *1*.

Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру со смесью растворителей спирт 96 % – хлороформ – аммиака раствор концентрированный 25 % – вода (6:2:0,5:1,5) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт подвижной фазы пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, опрыскивают спиртовым раствором нингидрина и помещают в сушильный шкаф на 2 мин при температуре 105 – 110 °С.

На хроматограмме испытуемого раствора *А* помимо основного пятна допускается наличие дополнительного пятна, которое по величине и интенсивности окраски не должно превышать пятно на хроматограмме раствора сравнения *2* (0,04 мкг, не более 0,1 %).

На хроматограмме испытуемого раствора *Б* помимо основного пятна допускается наличие дополнительного пятна, которое по величине и интенсивности окраски не должно превышать пятно на хроматограмме раствора сравнения *1* (0,08 мкг, не более 0,2 %).

Результаты испытания считаются достоверными, если на хроматограмме раствора сравнения *3* (0,02 мкг) четко видно пятно. На хроматограмме смеси для проверки пригодности хроматографической системы должны быть пятна 2-аминоэтанола и таурина.

Потеря в массе при высушивании. Не более 0,2% (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Точную навеску около 1,0 г субстанции высушивают при температуре от 70 до 80 °С.

Хлориды. Не более 0,005 %. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Хлориды», используя раствор, полученный в испытании «Прозрачность раствора».

Сульфаты. Не более 0,025 % (ОФС «Сульфаты»). Для определения используют раствор, полученный в испытании «Прозрачность раствора».

Сульфатная зола. Не более 0,1% (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

Тяжелые металлы. Не более 0,001 %. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Тяжёлые металлы» в зольном остатке, полученном после сжигания 1,0 г субстанции (ОФС «Сульфатная зола»).

Железо. Не более 0,003 % (ОФС «Железо»). Для определения используют зольный остаток субстанции. 1,0 г субстанции помещают в тигель, нагревают на плитке до получения черного остатка, затем прокаливают в муфельной печи при температуре от 700 до 750 °С в течение 30 мин.

Остаточные органические растворители. В соответствии с требованиями ОФС «Остаточные органические растворители».

***Бактериальные эндотоксины.** Не более 0,58 ЕЭ на 1 мг таурина (ОФС «Бактериальные эндотоксины»). Для проведения испытания готовят исходный раствор субстанции 40 мг/мл, а затем разводят его не менее чем в 10 раз.

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

Количественное определение. Около 0,15 г (точная навеска) субстанции растворяют в 30 мл воды, прибавляют 5 мл формалина и титруют 0,1 М раствором натрия гидроксида до появления слабо-розового окрашивания (индикатор – 0,06 мл 1 % раствора фенолфталеина) или определяют точку эквивалентности потенциометрически.

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида соответствует 12,52 мг таурина $C_2H_7NO_3S$.

Хранение. В хорошо укупоренной упаковке, в защищенном от света месте.

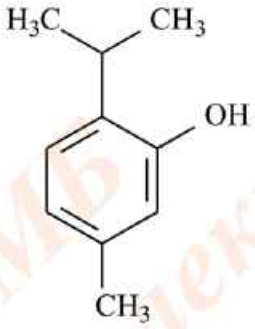
Федеральная электронная медицинская библиотека ЭЭМБ

*Контроль по показателям качества «Прозрачность раствора», «Цветность раствора» и «Бактериальные эндотоксины» проводят в субстанциях, предназначенных для производства лекарственных препаратов для парентерального применения.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Тимол	**ФС.2.1.0040.15**
Тимол	**Взамен ГФ X, ст. 681;**
Thymolum	**взамен ФС 42-1010-75**

5-Метил-2-(пропан-2-ил)фенол



$C_{10}H_{14}O$ М. м. 150,22

Содержит не менее 99,0 % тимола $C_{10}H_{14}O$.

Описание. Бесцветные кристаллы или кристаллический порошок с характерным запахом.

Растворимость. Очень легко растворим в спирте 96 %, легко растворим в хлороформе, жирных маслах, 10 % растворе натрия гидроксида, очень мало растворим в воде.

Подлинность. *1. ИК-спектр.* ИК-спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области частот от 4000 до 400 $см^{-1}$ по положению полос поглощения должен соответствовать спектру стандартного образца тимола.

2. Качественная реакция. 5 мг субстанции растворяют в 1 мл уксусной кислоты ледяной, прибавляют 0,3 мл серной кислоты концентрированной и 0,05 мл азотной кислоты концентрированной; в отраженном свете должно наблюдаться сине-зеленое окрашивание, в проходящем свете – темно-

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

красное.

3. Качественная реакция. 0,2 г субстанции нагревают на водяной бане с 1 мл 10 % раствора натрия гидроксида; образуется бесцветный прозрачный раствор, приобретающий при дальнейшем нагревании желтовато-розовое окрашивание. К подогретому раствору прибавляют 0,10 – 0,15 мл хлороформа и взбалтывают; должно появиться красно-фиолетовое окрашивание.

Температура плавления. От 48 до 52 °С (ОФС «Температура плавления», капиллярный метод, без предварительного высушивания).

Кислотность. 1 г субстанции помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 20 мл воды, нагревают до полного растворения, охлаждают и перемешивают в течение 1 мин. Затем прибавляют 1 – 2 кристалла субстанции для начала кристаллизации, перемешивают в течение 1 мин и фильтруют. К 5 мл фильтрата прибавляют 0,05 мл 0,05 % раствора метилового красного и 0,05 мл 0,01 М раствора натрия гидроксида; должно появиться желтое окрашивание.

Родственные примеси. Определение проводят методом газовой хроматографии (ГХ).

Испытуемый раствор. Около 0,1 г (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в 5 мл спирта 96 %, доводят объем спиртом 96 % до метки и перемешивают.

Раствор сравнения А. 1,0 мл испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают.

Раствор сравнения Б. 1,0 мл раствора сравнения *А* помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают.

Раствор сравнения В. 5,0 мл раствора сравнения *Б* помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают.

Хроматографические условия

Колонка — из нержавеющей стали, 300 × 0,3 см, 15 % полиэтиленгликоля 20000 (карбовакс 20 М) на хроматоне N-AW-DMCS с размером частиц 0,16 – 0,20 мм (95 – 70 меш);

Газ-носитель — гелий, 30 мл/мин;

Температура колонки

Время, мин	Температура
0 – 2	80 °С
2 – 17	80 → 200°С (8 °С/мин)
17 – 32	200 °С

Температура детектора — 210 °С;

Температура испарителя — 210 °С;

Детектор — пламенно-ионизационный;

Скорость водорода — 30 мл/мин;

Скорость воздуха — 300 мл/мин;

Объём пробы — 0,4 мкл.

Хроматографируют испытуемый раствор и растворы сравнения *А, Б* и *В* не менее 3 раз.

Хроматографическая система считается пригодной, если фактор асимметрии для пика тимола на хроматограмме испытуемого раствора не более 1,2; соотношение «сигнал/шум» для пика тимола на хроматограмме раствора сравнения *Б* не менее 5.

На хроматограмме испытуемого раствора сумма площадей всех пиков, кроме основного, не должна превышать площадь основного пика на хроматограмме раствора сравнения *А* (не более 1,0 %).

Не учитывают пики с площадью, меньшей площади основного пика на хроматограмме раствора сравнения *В* (менее 0,05 %).

Нелетучий остаток. Не более 0,05 %. Около 2,0 г (точная навеска) субстанции помещают в металлический или стеклянный бюкс и нагревают на водяной бане до полного улетучивания. Сушат в сушильном шкафу при температуре от 100 до 105 °С до постоянной массы.

Остаток не должен превышать 1,0 мг.

Федеральный ФЭМБ
медицинская библиотека

Остаточные органические растворители. В соответствии с требованиями ОФС «Остаточные органические растворители».

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

Количественное определение. Около 0,5 г (точная навеска) субстанции растворяют в 5 мл 10 % раствора натрия гидроксида в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 10,0 мл полученного раствора переносят в колбу с притертой пробкой, прибавляют 0,5 г калия бромида, 40 мл хлористоводородной кислоты разведённой 8,3 %, 3 капли 0,1 % раствора метилового оранжевого и при сильном взбалтывании титруют 0,0167 М раствором калия бромата до исчезновения розового окрашивания (к концу титрования прибавляют еще 2 капли 0,1 % раствора метилового оранжевого).

Параллельно проводят контрольный опыт.

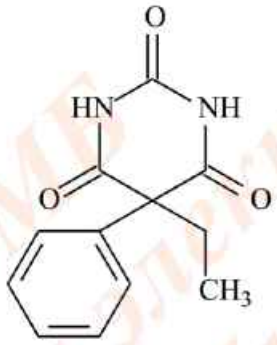
1 мл 0,0167 М раствора калия бромата соответствует 3,755 мг тимола $C_{10}H_{14}O$.

Хранение. В плотно укупоренной упаковке, в защищённом от света месте.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Фенобарбитал	**ФС.2.1.0041.15**
5-Фенил-5-этилбарбитуровая кислота	**Взамен ГФ X, ст. 517;**
Phenobarbitalum	**взамен ФС 42-2424-93**

5-Фенил-5-этилпиримидин-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-трион



$C_{12}H_{12}N_2O_3$ М. м. 232,24

Содержит не менее 99,0 % и не более 101,0 % фенобарбитала $C_{12}H_{12}N_2O_3$ в пересчете на сухое вещество.

Описание. Белый кристаллический порошок или бесцветные кристаллы.

Растворимость. Легко растворим в спирте 96 %, умеренно растворим в хлороформе, очень мало растворим в воде.

Подлинность. *1. ИК-спектр.* Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области частот от 4000 до 400 $см^{-1}$ по положению полос поглощения должен соответствовать спектру стандартного образца фенобарбитала.

2. УФ-спектр. 0,01 г субстанции растворяют в 100 мл спирта 96 %.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

5,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора буферным раствором pH 10 до метки и перемешивают. Ультрафиолетовый спектр поглощения полученного раствора в области длин волн от 220 до 280 нм должен иметь максимум поглощения при 240 нм и минимум поглощения при 224 нм.

3. Качественная реакция. 0,1 г субстанции взбалтывают с 2 мл спирта 96 %, прибавляют 1 каплю 20 % раствора кальция хлорида, 2 капли 5 % раствора кобальта нитрата и 2 капли 20 % раствора натрия гидроксида; должно появиться сине-фиолетовое окрашивание.

Температура плавления. От 175 до 179 °С (ОФС «Температура плавления»).

***Прозрачность раствора**. 0,25 г субстанции растворяют в 5 мл 10 % раствора натрия карбоната безводного. Полученный раствор должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

***Цветность раствора.** Раствор, полученный в испытании на «Прозрачность раствора», должен быть бесцветным (ОФС «Степень окраски жидкостей»).

Кислотность. 1 г субстанции кипятят с 50 мл воды в течение 2 мин, охлаждают и фильтруют. К 10 мл фильтрата прибавляют 0,15 мл 0,1 % спиртового раствора метилового красного. Раствор окрашивается в оранжево-желтый цвет. Для перехода окраски в желтый цвет должно потребоваться не более 0,1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида.

Родственные примеси. Определение проводят методом тонкослойной хроматографии (ТСХ).

Испытуемый раствор. 0,1 г субстанции растворяют в 5 мл спирта 96 %.

Раствор сравнения А. 0,5 мл испытуемого раствора разбавляют спиртом 96 % до 100 мл.

Раствор сравнения Б. 25 мл раствора сравнения *А* разбавляют спиртом 96 % до 50 мл.

Раствор для проверки пригодности хроматографической системы. 15 мл раствора сравнения Б разбавляют спиртом 96 % до 25 мл.

Подвижная фаза. Готовят смесь: аммиака раствор концентрированный 25 % – спирт 96 % – хлороформ (5:15:80). Дают смеси отстояться до разделения слоев и в качестве элюента используют нижний слой.

Раствор используют свежеприготовленным.

На линию старта пластинки Силикагель 60 F_{254}, предварительно промытой метанолом и высушенной при температуре от 80 до 85 °С в течение 7 мин, наносят по 10 мкл испытуемого раствора (200 мкг), раствора сравнения *А* (1 мкг), раствора сравнения *Б* (0,5 мкг) и раствора для проверки пригодности хроматографической системы (0,3 мкг). Пластинку с нанесенными пробами сушат в токе теплого воздуха в течение 5 мин, помещают в камеру с подвижной фазой и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт подвижной фазы пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры и немедленно просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм. После этого пластинку опрыскивают дифенилкарбазон-ртутным реактивом, сушат в токе теплого воздуха в течение 5 мин и опрыскивают свежеприготовленным 0,66 % спиртовым раствором калия гидроксида. Пластинку нагревают при температуре от 100 до 105 °С в течение 5 мин и немедленно просматривают.

Любое дополнительное пятно на хроматограмме испытуемого раствора при просмотре в УФ-свете и после проявления не должно превышать по величине и интенсивности поглощения или окраски пятна на хроматограмме раствора сравнения А (не более 0,5 %).

Суммарное содержание примесей должно быть не более 0,75 %.

Хроматографическая система считается пригодной, если на хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы четко видно пятно.

Потеря в массе при высушивании. Не более 0,5 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Для определения используют около 0,5 г

(точная навеска) субстанции.

Сульфаты. Не более 0,02 % (ОФС «Сульфаты»). Для определения используют раствор, полученный в испытании «Прозрачность раствора».

Сульфатная зола. Не более 0,1 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

Тяжелые металлы. Не более 0,001 %. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Тяжёлые металлы» в зольном остатке, полученном после сжигания 1,0 г субстанции (ОФС «Сульфатная зола»).

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

Количественное определение. Около 0,2 г (точная навеска) субстанции растворяют в 5 мл предварительно нейтрализованного по тимолфталеину спирта 96 %, прибавляют 5 мл воды и титруют 0,1 М раствором натрия гидроксида до появления синего окрашивания (индикатор – 0,5 мл 0,1 % раствора тимолфталеина).

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида соответствует 23,22 мг фенобарбитала $C_{12}H_{12}N_2O_3$.

Хранение. В хорошо укупоренной упаковке, в защищенном от света месте.

*Контроль по показателям качества «Прозрачность раствора» и «Цветность раствора», проводят в субстанции, предназначенной для производства лекарственных препаратов для парентерального применения.

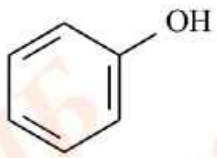
Федеральный электронный медицинский библиотека

Фенол **ФС.2.1.0042.15**

Фенол

Phenolum **Взамен ГФ IX, ст. 376**

Фенол



C_6H_6O М. м. 94,11

Содержит не менее 99,0 % фенола C_6H_6O в пересчете на безводное вещество.

Описание. Бесцветные кристаллы или кристаллическая масса белого цвета со своеобразным запахом. На воздухе постепенно розовеет.

Растворимость. Очень легко растворим в спирте 96 %, глицерине, хлороформе, метиленхлориде, растворим в воде, умеренно растворим в минеральных маслах.

Подлинность

1,0 г субстанции растворяют в 150 мл воды (раствор А).

1. Качественная реакция. К 10 мл раствора А прибавляют 0,3 мл 3 % раствора железа(III) хлорида; должно появиться фиолетовое окрашивание, исчезающее от прибавления 5 мл 2-пропанола.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

2. *Качественная реакция.* К 10 мл раствора А прибавляют 1 мл бромной воды; должен образоваться осадок белого или бледно-желтого цвета.

Температура затвердевания. Не ниже 39,5 °С (ОФС «Температура затвердевания»).

Нелетучий остаток. Не более 0,05 %. Около 5,0 г (точная навеска) субстанции помещают в бюкс, нагревают на кипящей водяной бане до полного испарения, затем сушат в сушильном шкафу при температуре от 100 до 105 °С в течение 1 ч. Масса сухого остатка должна быть не более 2,5 мг.

***Прозрачность раствора.** Раствор 1 г субстанции в 15 мл воды должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

***Цветность раствора.** Окраска раствора, полученного в испытании «Прозрачность раствора», не должна превышать эталон B_6 (ОФС «Степень окраски жидкостей»).

Кислотность. К 2 мл раствора, полученного в испытании на «Прозрачность раствора», прибавляют 0,05 мл 0,1 % спиртового раствора метилового оранжевого. Раствор должен окраситься в желтый цвет.

Вода. Не более 0,5 % (ОФС «Определение воды»). Для определения используют около 3,0 г (точная навеска) субстанции.

Остаточные органические растворители. В соответствии с требованиями ОФС «Остаточные органические растворители».

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

Количественное определение. Около 2,0 г (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в 50 мл воды, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 25 мл полученного раствора переносят в коническую колбу вместимостью 500 мл с пришлифованной пробкой, прибавляют 50,0 мл 0,0167 М раствора бромид-бромата и 5 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, закрывают

пробкой, выдерживают в течение 30 мин, периодически перемешивая, после чего оставляют на 15 мин.

Затем в колбу прибавляют 5 мл 20 % раствора калия йодида, перемешивают и титруют 0,1 М раствором натрия тиосульфата до появления светло-желтой окраски. К полученному раствору прибавляют 0,5 мл раствора крахмала, 10 мл хлороформа и продолжают титрование при энергичном перемешивании.

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,0167 М раствора бромид-бромата соответствует 1,569 мг C_6H_6O.

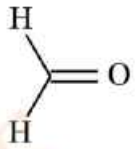
Хранение. В плотно укупоренной упаковке, в защищенном от света месте.

*Контроль по показателям качества «Прозрачность раствора» и «Цветность раствора» проводят в субстанции, предназначенной для производства лекарственных препаратов для парентерального применения.

ФГБУ «Федеральная электронная медицинская библиотека»

Формальдегида раствор	**ФС.2.1.0043.15**
Формальдегид	
Formaldehydi solution	**Взамен ГФ X, ст. 619**

Формальдегид



CH_2O М. м. 30,03

Содержит не менее 34,5 % и не более 38,0 % формальдегида CH_2O.

Стабилизируют прибавлением метанола.

Описание. Прозрачная бесцветная жидкость с резким характерным запахом.

Растворимость. Смешивается с водой и спиртом 96 %.

Подлинность. *1. Качественная реакция.* К 2 мл субстанции прибавляют 10 мл воды, 1 мл 5 % аммиачного раствора серебра нитрата; выделяется металлическое серебро в виде зеркала или серого осадка.

2. Качественная реакция. 20 мг салициловой кислоты растворяют в 5 мл серной кислоты концентрированной. К полученному раствору прибавляют 2 капли субстанции и осторожно нагревают, должно появиться неисчезающее ярко-красное окрашивание.

Муравьиная кислота. Не более 0,2 %. К 10 мл (точная навеска) субстанции прибавляют 1 % раствор фенолфталеина и титруют 0,1 М раствором натрия гидроксида до розового окрашивания.

1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида соответствует 4,6 мг

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

муравьиной кислоты CH_2O_2.

Метанол. От 9,0 до 15,0 %. Определение проводят методом газовой хроматографии (ГХ).

Раствор внутреннего стандарта. 10,0 мл этанола безводного помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают.

Испытуемый раствор. 10 мл раствора формальдегида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 10,0 мл раствора внутреннего стандарта, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Стандартный раствор. 1,0 мл метанола безводного помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 10,0 мл раствора внутреннего стандарта, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Хроматографические условия

Колонка	стеклянная, насадочная, (1,5 – 2,0 м)×(2 – 4 мм) с неподвижной фазой (НФ) – сополимер этилстирол-дивинилбензол, 150 – 180 мкм (90 – 80 меш);
Газ-носитель	азот;
Скорость потока	30 – 40 мл/мин;
Температура:	
колонки	120 °С;
испарителя	150 °С;
детектора	150 °С;
Детектор	пламенно-ионизационный;
Объем пробы	1 мкл.

Проверка пригодности хроматографической системы. Хроматографируют стандартный раствор. Хроматографическая система считается пригодной, если разрешение (R) между пиками метанола и этанола не менее 2,0.

Хроматографируют попеременно испытуемый и стандартный

растворы.

Содержание метанола в субстанции (X) в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{V_M \cdot B}{V \cdot B_0} \cdot 100$$

где V – объем субстанции, взятый для приготовления испытуемого раствора, мл;

V_M – объем метанола, взятый для приготовления стандартного раствора (1,0 мл);

B – среднее значение отношения площади пика метанола к площади пика этанола на хроматограммах испытуемого раствора;

B_0 – среднее значение отношения площади пика метанола к площади пика этанола на хроматограммах стандартного раствора;

Общая зола. Не более 0,005 % (м/о). 20,0 мл субстанции выпаривают на водяной бане досуха. Полученную белую массу сжигают и прокаливают при температуре около 600 °С.

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

Количественное определение. Около 1,0 г (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят водой до метки. 5 мл полученного раствора переносят в колбу с притертой пробкой, прибавляют 20 мл 0,05 М раствора йода и 10 мл 1 М раствора натрия гидроксида, взбалтывают и оставляют в темном месте на 10 мин. Затем прибавляют 11 мл 0,5 М раствора серной кислоты и выделившийся йод титруют 0,1 М раствором натрия тиосульфата до получения слабо-желтой окраски. Прибавляют 2 мл раствора крахмала и титруют до обесцвечивания раствора.

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,05 М раствора йода соответствует 1,501 мг формальдегида CH_2O.

Хранение. В защищенном от света месте, при температуре не ниже

+15 °С.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Фуксин основной	**ФС.2.1.0044.15**
Фуксин основной	
Fuxinum basicum	**Вводится впервые**

Смесь розанилина гидрохлорида и парарозанилина гидрохлорида.

Розанилина гидрохлорид

4-[(4-Аминофенил)(4-иминоциклогекса-2,5-диен-1-илиден)метил]-2-метиланилина гидрохлорид

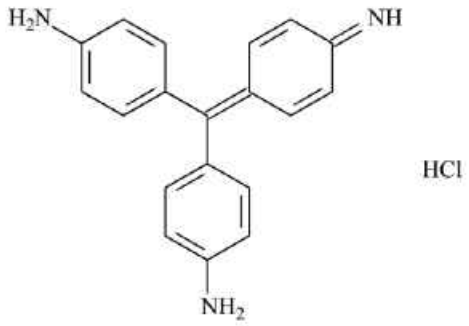


$C_{20}H_{19}N_3 \cdot HCl$ М. м. 337,85

Парарозанилина гидрохлорид

4,4'-[(4-Иминоциклогекса-2,5-диен-1-илиден)метилен]дианилина гидрохлорид

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека



$C_{19}H_{17}N_3 \cdot HCl$ М. м. 323,82

Содержит не менее 88,0 % розанилина гидрохлорида $C_{20}H_{19}N_3 \cdot HCl$ в пересчёте на сухое вещество.

Описание. Темно-зеленые кристаллы или кристаллический порошок с металлическим блеском.

Растворимость. Растворим в спирте 96 % и хлористоводородной кислоте разведенной 8,3 %, очень мало растворим в воде.

Подлинность

1. Спектроскопия. 0,1 г субстанции растворяют в 50 мл воды (раствор *А*).

К 5 мл раствора *А* прибавляют 15 мл воды и перемешивают. Спектр полученного раствора имеет максимум поглощения при 543 ± 5 нм.

2. Качественная реакция. К 2,5 мл раствора *А* прибавляют 2,5 мл воды и несколько капель хлористоводородной кислоты концентрированной. Через некоторое время раствор должен окраситься в желтый цвет (отличие от фуксина кислого).

3. Качественная реакция. К 5 мл раствора *А* прибавляют несколько капель таниновой кислоты; должен образоваться красный осадок.

Потеря в массе при высушивании. Не более 5,0 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

Сульфатная зола. Не более 0,3% (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

Вещества, нерастворимые в спирте. Около 1,0 г (точная навеска) субстанции помещают в круглодонную колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл спирта 96 % и кипятят на водяной бане с обратным холодильником в течение 15 мин. Раствор фильтруют через предварительно взвешенный стеклянный фильтр. Фильтр промывают горячим спиртом 96 % до обесцвечивания промывных вод и высушивают при температуре 105 °С в течение 1 ч. Содержание веществ, нерастворимых в спирте, не должно превышать 1,0 %.

Мышьяк. Не более 0,0008 % (ОФС «Мышьяк»). Для определения используют 0,06 г субстанции.

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

Количественное определение. Определение проводят методом титриметрии.

0,05 М раствор титана(III) хлорида. 10,0 г титана(III) хлорида растворяют в воде и доводят объем раствора водой до 100 мл. К 75 мл полученного раствора прибавляют 75 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, разбавляют водой до 1000 мл и перемешивают.

Установка титра. Проводят непосредственно перед использованием. 20,0 мл 0,1 М раствора железа(III) аммония сульфата помещают в герметичную колбу для титрования и пропускают через раствор углерода диоксид до полного удаления воздуха. Прибавляют около 35 мл 0,05 М раствора титана(III) хлорида, 5 мл 8 % раствора аммония тиоцианата и продолжают титрование раствором титана(III) хлорида до обесцвечивания раствора.

1 мл 0,1 М раствора железа(III) аммония сульфата соответствует 15,43 мг $TiCl_3$.

Около 0,1 г (точная навеска) субстанции помещают в герметичную

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

колбу для титрования вместимостью 500 мл, снабжённую газовпускной и газовыпускной трубками, обратным холодильником и бюреткой, и прибавляют 175 мл воды. Затем прибавляют 25 мл 30 % раствора натрия тартрата, помещают в колбу магнитную мешалку с тефлоновым покрытием и нагревают до кипения. В течение 15 мин колбу продувают азотом, предварительно пропущенным через 2 склянки для промывания газа, каждая из которых содержит 500 мл смеси, состоящей из 400 мл воды, 40 мл 20 % раствора титана(III) хлорида, 40 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и около 10 мг сафранина. Продолжая нагревание и продувку азотом, раствор титруют при перемешивании 0,05 М раствором титана(III) хлорида до появления жёлтого окрашивания.

Параллельно проводят контрольный опыт.

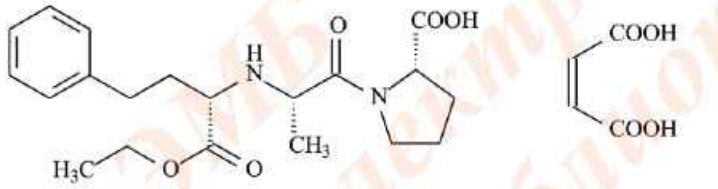
1 мл 0,05 М раствора титана(III) хлорида соответствует 3,379 мг розанилина гидрохлорида $C_{20}H_{19}N_3 \cdot HCl$.

Хранение. В хорошо укупоренной упаковке, в защищенном от света месте.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Эналаприла малеат	**ФС.2.1.0045.15**
Эналаприла малеат	
Enalaprili maleas	**Вводится впервые**

(2*S*)-1-((2*S*)-2-{[(1*S*)-3-Фенил-1-(этоксикарбонил)пропил]амино}пропаноил)пирролидин-2-карбоновой кислоты (2*Z*)-бут-2-ендиоат (1:1)



$C_{20}H_{28}N_2O_5 \cdot C_4H_4O_4$ М. м. 492,5

Содержит не менее 98,5 % и не более 101,5 % эналаприла малеата $C_{20}H_{28}N_2O_5 \cdot C_4H_4O_4$ в пересчете на сухое вещество.

Описание. Белый или почти белый кристаллический порошок.

Растворимость. Легко растворим в метаноле и диметилформамиде, растворим в спирте 96 %, умеренно растворим в воде, практически нерастворим в хлороформе.

Подлинность. 1. *ИК-спектр*. Инфракрасный спектр субстанции, снятый в суспензии с вазелиновым маслом, в области частот от 4000 до 400 $см^{-1}$ по положению полос поглощения должен соответствовать спектру стандартного образца эналаприла малеата.

2. *ВЭЖХ*. Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания

ФЭБ Федеральная электронная библиотека

основного пика на хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы (раздел «Родственные примеси»).

Температура плавления. От 142 до 147 °С (ОФС «Температура плавления»).

Удельное вращение. От –41,0° до –43,5° в пересчете на сухое вещество (1 % раствор субстанции в метаноле, ОФС «Поляриметрия»).

pH. От 2,0 до 3,0 (1 % раствор, ОФС «Ионометрия», метод 3).

Родственные примеси. Определение проводят методом ВЭЖХ.

Буферный раствор А (pH 2,5). 2,8 г натрия фосфата однозамещенного растворяют в 900 мл воды, доводят pH раствора фосфорной кислотой до 2,5, доводят объем раствора водой до 1000 мл и перемешивают.

Буферный раствор Б (pH 6,8). 2,8 г натрия фосфата однозамещенного растворяют в 900 мл воды, доводят pH раствора 9 М раствором натрия гидроксида до 6,8, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

*Подвижная фаза А (*ПФА*).* Буферный раствор Б – ацетонитрил (95:5).

*Подвижная фаза Б (*ПФБ*).* Буферный раствор Б – ацетонитрил (34:66).

Растворитель. Буферный раствор *А* – ацетонитрил (95:5).

Испытуемый раствор. 30,0 мг субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 25 мл растворителя, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают.

Раствор сравнения. 1 мл испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают.

Раствор для проверки пригодности хроматографической системы. 20 мг стандартного образца эналаприла малеата помещают в химический стакан вместимостью 100 мл. Стакан нагревают на электрической плитке на половине от максимальной температуры в течение 5 – 10 мин до расплавления вещества, сразу после чего стакан убирают и дают остыть. Необходимо избегать перегрева вещества, выражающегося в появлении коричневой окраски вещества. К охлажденному остатку прибавляют 50 мл

Фармацевтическая электронная библиотека

ацетонитрила, полученную смесь обрабатывают ультразвуком в течение нескольких минут до растворения. Полученный раствор обычно содержит 0,2 – 0,4 мг/мл эналаприла дикетопиперазина.

Хроматографические условия

Колонка	150 мм × 4,1 мм, сополимер стирол-дивинилбензол, 5 мкм;
Скорость потока	1,0 мл/мин;
Температура колонки	70 °С;
Детектор	спектрофотометрический, 215 нм;
Объем пробы	50 мкл.

Градиентное элюирование

Время, мин	ПФА, %	ПФБ, %
0 – 20	95 → 40	5 → 60
20 – 25	40	60
25 – 26	40 → 95	60 → 5
26 – 30	95	5

Хроматографируют раствор для проверки пригодности хроматографической системы. Время удерживания эналаприла дикетопиперазина относительно эналаприла – около 2,1. Разрешение (*R*) между пиками эналаприла и эналаприла дикетопиперазина не менее 3,5.

Относительное стандартное отклонение для площади пика эналаприла не более 1,0 %.

Хроматографируют испытуемый раствор и раствор сравнения.

На хроматограмме испытуемого раствора площадь пика со временем удерживания относительно основного пика около 1,1 не должна превышать площадь пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 1,0 %). Площадь любого другого пика, кроме основного, должна быть не более 0,3 площади основного пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,3 %); сумма площадей таких пиков должна быть не более площади основного пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 1,0 %).

Не учитываются пик малеиновой кислоты и пики с площадью менее 0,05 площади основного пика на хроматограмме раствора сравнения.

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

Потеря в массе при высушивании. Не более 1,0 %. Определение проводят одним из методов.

1) Около 1,0 г (точная навеска) субстанции сушат при температуре 60 °С при остаточном давлении не выше 5 мм рт.ст. в течение 2 ч.

2) Около 1,0 г (точная навеска) субстанции сушат при температуре от 100 до 105 °С до постоянной массы.

Сульфатная зола. Не более 0,1 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

Тяжелые металлы. Не более 0,001 %. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Тяжёлые металлы» в зольном остатке, полученном после сжигания 1,0 г субстанции (ОФС «Сульфатная зола»).

Остаточные органические растворители. В соответствии с требованиями ОФС «Остаточные органические растворители».

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

Количественное определение. Около 0,3 г (точная навеска) субстанции растворяют при перемешивании в 20 мл уксусной кислоты ледяной, прибавляют 5 мл уксусного ангидрида и титруют 0,1 М раствором хлорной кислоты до зеленого окрашивания (индикатор – 0,3 мл 0,1 % раствора кристаллического фиолетового).

Параллельно проводят контрольный опыт.

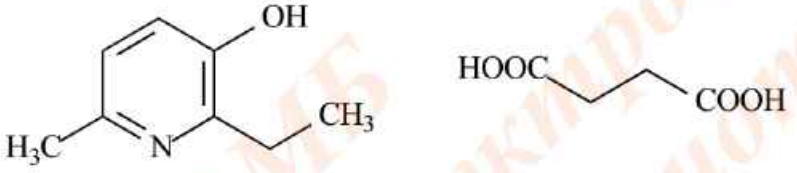
1 мл 0,1 М раствора хлорной кислоты соответствует 49,25 мг эналаприла малеата $C_{20}H_{28}N_2O_5 \cdot C_4H_4O_4$.

Хранение. В хорошо укупоренной упаковке, в защищенном от света месте.

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

Этилметилгидроксипиридина сукцинат	**ФС.2.1.0046.15**
Этилметилгидроксипиридина сукцинат	
Ethylmethylhydroxypyridini succinas	**Взамен ВФС 42-2797-96**

6-Метил-2-этилпиридин-3-ола бутандиоат (1:1)



$C_8H_{11}NO \cdot C_4H_6O_4$ М. м. 255,27

Содержит не менее 99,0 % этилметилгидроксипиридина сукцината $C_8H_{11}NO$ $C_4H_6O_4$ в пересчете на сухое вещество.

Описание. Белый или почти белый кристаллический порошок.

Растворимость. Легко растворим в воде, растворим в спирте 96 %, практически нерастворим в хлороформе.

Подлинность

1. *ИК-спектр.* Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области частот от 4000 до 400 $см^{-1}$ по положению полос поглощения должен соответствовать полосам поглощения рисунка спектра этилметилгидроксипиридина сукцината (Приложение).

2. *УФ-спектр.* Ультрафиолетовый спектр поглощения 0,001 % раствора субстанции в 0,01 М растворе хлористоводородной кислоты в области длин волн от 240 до 330 нм должен иметь максимум поглощения при 297 нм.

Федеральный ФЭМБ Электронная медицинская библиотека

3. Качественная реакция. 0,05 г субстанции растворяют в 1 мл воды. К полученному раствору прибавляют 0,1 мл 3 % раствора железа(III) хлорида; должно появиться красное окрашивание, исчезающее при прибавлении серной кислоты разведенной 16 %.

4. Качественная реакция. В сухую пробирку вносят 0,005 г субстанции и 0,01 г резорцина, прибавляют 0,1 мл серной кислоты концентрированной и осторожно нагревают над пламенем горелки до тех пор, пока смесь не окрасится в темно-коричневый цвет. После охлаждения прибавляют 0,5 мл воды, затем 10 % раствор натрия гидроксида до щелочной реакции, после чего разбавляют водой до 20 мл; должно наблюдаться образование раствора оранжевого цвета, имеющего интенсивную зеленую флуоресценцию.

***Прозрачность раствора**. Раствор 0,5 г субстанции в 10 мл воды должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

***Цветность раствора.** Раствор, полученный в испытании на «Прозрачность раствора», должен выдерживать сравнение с эталоном Y_6 или BY_6 (ОФС «Степень окраски жидкостей»).

pH. От 4,0 до 5,0 (5 % раствор, ОФС «Ионометрия», метод 3).

Родственные примеси. Определение проводят методом тонкослойной хроматографии (ТСХ).

Испытуемый раствор. 0,2 г субстанции растворяют в 10 мл спирта 96 %.

Раствор сравнения. 1 мл испытуемого раствора разбавляют спиртом 96 % до 200 мл.

На линию старта пластинки со слоем силикагеля 60 F_{254} наносят 0,01 мл (200 мкг) испытуемого раствора, 0,01 мл (1 мкг) и 0,006 мл (0,6 мкг) раствора сравнения. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру со смесью растворителей ацетон – этилацетат – аммиака раствор концентрированный 25 % (5:5:0,1) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт подвижной фазы пройдет около 80 – 90 % длины

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и просматривают в УФ свете при длине волны 254 нм.

На хроматограмме испытуемого раствора помимо основного пятна допускается пятно примеси, которое по величине и интенсивности поглощения не должно превышать пятно на хроматограмме раствора сравнения (1 мкг) (не более 0,5 %).

Результаты испытания считаются достоверными, если R_f основного пятна на хроматограмме испытуемого раствора составляет около 0,9, а на хроматограмме раствора сравнения (0,6 мкг) четко видно пятно.

Потеря в массе при высушивании. Не более 0,5 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1, при температуре от 70 до 80 °С). Для определения используют около 0,5 г (точная навеска) субстанции.

Сульфатная зола. Не более 0,1 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

Тяжелые металлы. Не более 0,001 %. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Тяжёлые металлы» в зольном остатке, полученном после сжигания 1,0 г субстанции (ОФС «Сульфатная зола»).

Остаточные органические растворители. В соответствии с требованиями ОФС «Остаточные органические растворители».

***Бактериальные эндотоксины.** Не более 0,43 ЕЭ на 1 мг субстанции (ОФС «Бактериальные эндотоксины»). Для проведения испытания готовят исходный раствор субстанции (концентрация 50 мг/мл), а затем разводят его не менее чем в 200 раз.

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

Количественное определение. Около 0,23 г (точная навеска) субстанции помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 30 мл уксусной кислоты ледяной и титруют 0,1 М раствором хлорной кислоты до появления голубовато-зеленого окрашивания

(индикатор – 2 капли 0,1 % раствора кристаллического фиолетового) или определяют точку эквивалентности потенциометрически.

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,1 М раствора хлорной кислоты соответствует 25,53 мг $C_8H_{11}NO \cdot C_4H_6O_4$.

Хранение. В защищенном от света месте.

*Контроль по показателям качества «Прозрачность раствора», «Цветность раствора» и «Бактериальные эндотоксины» проводят в субстанциях, предназначенных для производства лекарственных препаратов для парентерального применения.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Этиловый эфир альфа-бромизовалериановой кислоты **ФС.2.1.0047.15**

Этилбромизовалерианат

Ethylis bromoisovaleras **Взамен ФС 42-3096-00**

Этил[(2*RS*)-2-бром-3-метилбутаноат]



$C_7H_{13}BrO_2$ М.м. 209,08

Содержит не менее 98,0 % этилбромизовалерианата $C_7H_{13}BrO_2$.

Описание. Бесцветная прозрачная жидкость с характерным эфирным запахом.

Растворимость. Очень легко растворим в спирте 96 %, хлороформе, эфире, практически нерастворим в воде.

Подлинность. *1. ИК-спектр.* Инфракрасный спектр субстанции, снятый в виде жидкой пленки, в области частот от 4000 $см^{-1}$ до 400 $см^{-1}$ по положению полос поглощения должен соответствовать рисунку спектра этилового эфира альфа-бромизовалериановой кислоты (Приложение).

2. Качественная реакция. 5 мл субстанции кипятят в течение 10 мин с 10 мл 10 % раствора натрия гидроксида и охлаждают (раствор А). К 2 мл раствора А прибавляют 2 мл воды хлорной или 5 % раствора хлорамина, 1 мл хлороформа, 10 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 % и

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

энергично встряхивают; хлороформный слой должен окраситься в оранжевый цвет.

3. Качественная реакция. 5 мл раствора А фильтруют через бумажный фильтр «белая лента», подкисляют 0,5 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 % и нагревают; должен появиться запах изовалериановой кислоты.

Примечание.

Приготовление воды хлорной. Пропускают поток хлора через воду (см. ГОСТ 4517-87, п.2.42). Хранят в небольших, заполненных доверху банках темного стекла с притертыми пробками в прохладном, защищенном от света месте.

Плотность. От 1,275 до 1,282 г/см^3 (ОФС «Плотность»).

Показатель преломления. От 1,449 до 1,450 (ОФС «Рефрактометрия»).

Кислотность. 1 мл субстанции растворяют в 10 мл спирта 96 %, предварительно нейтрализованного по фенолфталеину, и прибавляют 0,05 мл 1% раствора того же индикатора. Раствор должен окрашиваться в розовый цвет от прибавления не более 0,2 мл 0,05 М раствора натрия гидроксида.

Нелетучий остаток. Не более 0,1 %. 10 мл субстанции выпаривают на взвешенном часовом стекле на водяной бане досуха.

Родственные примеси. Определение проводят методом газовой хроматографии (ГХ).

Раствор для проверки пригодности хроматографической системы. По 0,1 г (точная навеска) стандартного образца этилового эфира альфа-бромизовалериановой кислоты (ФСО ГФУ или аналогичного качества) и стандартного образца этилового эфира изовалериановой кислоты (этил(3-метилбутаноат); ФСО ГФУ или аналогичного качества) помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 10 мл спирта 96 %, перемешивают, доводят объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

Хроматографические условия

Колонка	из нержавеющей стали 300,0 × 0,3 см, заполненная сорбентом, содержащим 10 % Reoplex-400 на Inerton super зернением 0,15 – 0,20 мм;
Температура термостата колонки	программируется от 75 °С до 185 °С со скоростью 6 °С/мин;
Температура детектора	190 °С;
Температура испарителя	180 °С;
Расход:	
Газа-носителя (гелий)	30 мл/мин;
воздуха	300 мл/мин;
Детектор	пламенно-ионизационный;
Объем пробы	0,2 – 0,3 мкл.

Хроматографируют раствор для проверки пригодности хроматографической системы, получая не менее 5 хроматограмм. При указанных условиях элюирования порядок выхода основных пиков следующий: этиловый эфир изовалериановой кислоты, этиловый эфир альфа-бромизовалериановой кислоты.

Хроматографическая система считается пригодной, если

- разрешение (*R*) между пиками этилового эфира изовалериановой кислоты и этилового эфира альфа-бромизовалериановой кислоты не менее 2;
- фактор асимметрии (*T*) для пика этилового эфира альфа-бромизовалериановой кислоты должен быть не более 1,5;
- относительное стандартное отклонение (*RSD*) площади пика этилового эфира альфа-бромизовалериановой кислоты должно быть не более 2,0 %;
- эффективность хроматографической колонки (*N*), рассчитанная по пику этилового эфира альфа-бромизовалериановой кислоты, не менее 600 т.т.

Хроматографируют испытуемый образец (этиловый эфир альфа-бромизовалериановой кислоты). Время регистрации хроматограммы испытуемого образца должно не менее чем в 1,5 раза превышать время удерживания основного пика.

Содержание любой единичной примеси в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_i \cdot 100}{\Sigma S_i + S},$$

где S_i – площадь пика примеси;

S – площадь пика этилового эфира альфа-бромизовалериановой кислоты;

ΣS_i – сумма площадей пиков всех примесей.

Содержание любой единичной примеси должно быть не более 0,5 %; сумма примесей должна быть не более 2 %.

Хлориды, бромиды. Не более 0,002 % (ОФС «Хлориды»).

2 мл субстанции встряхивают с 18 мл воды и 2 мл азотной кислоты разведенной 16 % в течение 1 мин и отделяют водный слой. Для анализа отбирают 10 мл водного слоя.

Сульфаты. 5 мл субстанции помещают в пробирку, прибавляют 5 мл воды и взбалтывают в течение 1 мин. После расслаивания смеси прибавляют 1 мл 5 % раствора бария хлорида, осторожно перемешивают и выдерживают в течение 15 мин. Не должно наблюдаться опалесценции в верхнем слое.

Тяжелые металлы. Не более 0,001 %. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Тяжёлые металлы» в зольном остатке, полученном после сжигания 1,0 г субстанции (ОФС «Сульфатная зола»).

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

Количественное определение. Около 0,25 г (точная навеска) субстанции растворяют в 20 мл спирта 96 % в колбе вместимостью 100 мл, прибавляют 20 мл 1 М раствора натрия гидроксида, кипятят с обратным холодильником в течение 30 мин, охлаждают и подкисляют азотной кислотой разведенной 12,5 % до кислой реакции по конго. К подкисленному раствора прибавляют 20 мл 0,1 М раствора серебра нитрата, избыток которого оттитровывают 0,1 М раствором аммония тиоцианата до розовато-

желтого окрашивания (индикатор – 2 мл раствора индикатора квасцов железоаммониевых).

Параллельно проводят контрольный опыт.

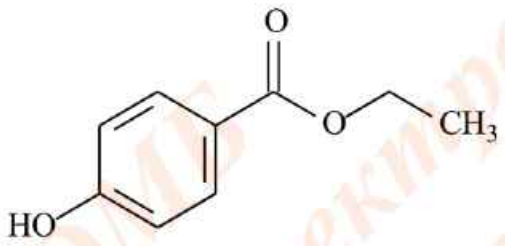
1 мл 0,1 М раствора серебра нитрата соответствует 20,908 мг $C_{17}H_{13}BrO_2$.

Хранение. В плотно укупоренной упаковке, в защищенном от света месте.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Этилпарагидроксибензоат	**ФС.2.1.0048.15**
Этилпарагидроксибензоат	
Ethylis parahydroxybenzoas	**Взамен ФС 42-0200-07**

Этил(4-гидроксибензоат)



$C_9H_{10}O_3$ М.м. 166,17

Содержит не менее 98,0 % и не более 102,0 % этилпарагидроксибензоата $C_9H_{10}O_3$.

Описание. Белый или почти белый кристаллический порошок или бесцветные кристаллы.

Растворимость. Легко растворим в спирте 96 % и метаноле, очень мало растворим в воде.

Подлинность

1. *ИК-спектр.* Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области частот от 4000 до 400 см $^{-1}$ по положению полос поглощения должен соответствовать спектру стандартного образца этилпарагидроксибензоата.

2. *Тонкослойная хроматография.* Основное пятно на хроматограмме испытуемого раствора *Б*, полученной при определении родственных

ФЭМБ Фармацевтическая электронная медицинская библиотека

примесей, по положению, интенсивности поглощения и величине должно соответствовать пятну на хроматограмме раствора сравнения *Б* этилпарагидроксибензоата.

Температура плавления. От 115 до 118 °С (ОФС «Температура плавления»). Субстанцию предварительно сушат в вакууме в эксикаторе над силикагелем безводным в течение 24 ч.

***Прозрачность раствора.** Раствор 1 г субстанции в 10 мл спирта 96 % должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

***Цветность раствора.** Раствор, полученный в испытании на «Прозрачность раствора», должен выдерживать сравнение с эталоном BY_6 (ОФС «Степень окраски жидкостей»).

Кислотность. 0,2 г субстанции растворяют в 5 мл спирта 96 %, прибавляют 5 мл воды, свободной от диоксида углерода, и 0,1 мл 0,05 % раствора бромкрезолового зеленого. Окраска раствора должна измениться от прибавления не более 0,1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида.

Родственные примеси. Определение проводят методом тонкослойной хроматографии (ТСХ).

Испытуемый раствор А. 0,1 г субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в ацетоне, доводят объем раствора ацетоном до метки и перемешивают.

Испытуемый раствор Б. 1,0 мл испытуемого раствора *А* помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора ацетоном до метки и перемешивают.

Раствор сравнения А. 0,5 мл испытуемого раствора *А* помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора ацетоном до метки и перемешивают.

Раствор сравнения Б. 0,01 г стандартного образца этилпарагидроксибензоата помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в ацетоне, доводят объем раствора ацетоном до метки и

перемешивают.

Раствор сравнения В. 0,01 г стандартного образца метилпарагидроксибензоата помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, прибавляют 1 мл испытуемого раствора *А*, доводят объем раствора ацетоном до метки и перемешивают.

На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля КС 18 F_{254} или аналогичной наносят по 2 мкл испытуемого раствора *А* (20 мкг), испытуемого раствора *Б* (2 мкг), раствора сравнения *А* (0,1 мкг), раствора сравнения *Б* (2 мкг стандартного образца этилпарагидроксибензоата) и раствора сравнения *В* (по 2 мкг метилпарагидроксибензоата и этилпарагидроксибензоата).

Пластинку сушат на воздухе в течение 5 мин, помещают в камеру со смесью растворителей уксусная кислота ледяная – вода – метанол (1:30:70) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт подвижной фазы пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм.

На хроматограмме испытуемого раствора *А*, кроме основного пятна, не должно быть пятен, по величине и интенсивности поглощения превышающих основное пятно на хроматограмме раствора сравнения *А* (не более 0,5 %).

Пятно на линии старта не учитывают.

Результаты анализа считаются достоверными, если на хроматограмме раствора сравнения *В* четко обнаруживаются 2 пятна.

Сульфатная зола. Не более 0,1 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

Остаточные органические растворители. В соответствии с требованиями ОФС «Остаточные органические растворители».

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

Количественное определение. Около 1,0 г (точная навеска) субстанции

помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 20,0 мл 1 М раствора натрия гидроксида, нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 1 ч и охлаждают. После охлаждения холодильник промывают 5 мл воды, прибавляя их к раствору. Оттитровывают избыток щелочи 0,5 М раствором серной кислоты.

Конечную точку титрования определяют потенциометрически.

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 1 М раствора натрия гидроксида соответствует 166,2 мг $C_9H_{10}O_3$.

Хранение. В хорошо укупоренной упаковке в защищенном от света месте при температуре не выше 15 °С.

*Контроль по показателям качества «Прозрачность раствора» и «Цветность раствора» проводят в субстанции, предназначенной для производства лекарственных препаратов для парентерального применения.

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

Бария сульфат	**ФС.2.2.0001.15**
Бария сульфат	**Взамен ФС 42-1222-97;**
Barii sulfas	**взамен ГФ XII, ч.1, ФС 42-0222-07**

Сульфат бария

$BaSO_4$ М.м. 233,39

Содержит не менее 97,5 % бария сульфата $BaSO_4$.

Описание. Белый или почти белый порошок.

Растворимость. Практически не растворим в воде, разведенных кислотах и щелочах и органических растворителях.

Подлинность

1. Качественная реакция. 1 г субстанции кипятят в течение 5 мин с 10 мл раствора натрия карбоната. Осадок отфильтровывают и промывают 10 мл воды. Охлажденный фильтрат, нейтрализованный хлористоводородной кислотой разведенной 8,3 %, дает характерную реакцию на сульфаты. Определение проводят в соответствии с ОФС «Общие реакции на подлинность».

2. Качественная реакция. Осадок на фильтре обрабатывают 5 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 % и фильтруют. К фильтрату прибавляют 1 мл серной кислоты разведенной 16 %; должен образоваться белый осадок.

Кислотность или щелочность. 5 г субстанции нагревают на водяной бане в течение 5 мин с 20 мл воды. После охлаждения раствор фильтруют. К 10 мл фильтрата прибавляют 0,05 мл 0,05 % раствора бромтимолового

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

синего; окраска раствора должна изменяться от прибавления не более 0,5 мл 0,01 М раствора натрия гидроксида или 0,01 М раствора хлористоводородной кислоты.

Кислоторастворимые вещества. 20 г субстанции кипятят в течение 5 мин со смесью 90 мл воды и 10 мл уксусной кислоты ледяной. Охлаждают, доводят объем раствора до первоначального и фильтруют. 25 мл фильтрата упаривают сначала на водяной бане, а затем высушивают при температуре от 100 до 105 °С до постоянной массы. Масса полученного осадка не должна превышать 0,015 г (не более 0,3 %).

Растворимые соли бария. К 10 мл фильтрата, полученного в испытании на «Кислоторастворимые вещества», прибавляют 1 мл серной кислоты разведенной 16 %.

Через 1 ч опалесценция раствора должна быть не более опалесценции смеси 10 мл того же фильтрата и 1 мл воды.

Сульфиды. 10 г субстанции кипятят со смесью 30 мл воды и 10 мл хлористоводородной кислоты 25 %, закрыв колбу бумагой, смоченной раствором свинца(II) ацетата; бумага в течение 5 мин не должна темнеть.

Хлориды. Не более 0,02 % (ОФС «Хлориды»). 1 г субстанции кипятят в течение 5 мин с 20 мл свежепрокипяченной воды и фильтруют. К фильтрату прибавляют 80 мл воды. Для определения отбирают 10 мл полученного раствора.

Сульфаты. Не более 0,1% (ОФС «Сульфаты»). Для определения отбирают 10 мл раствора, полученного в испытании «Хлориды».

Железо. Не более 0,003 % (ОФС «Железо»). 2 г субстанции нагревают до кипения со смесью 5 мл хлористоводородной кислоты 25 % и 15 мл воды и фильтруют. Для анализа отбирают 10 мл фильтрата.

Фосфаты. 2 г субстанции нагревают до кипения с 10 мл азотной кислоты и после охлаждения фильтруют. К фильтрату прибавляют 5 мл 10 % раствора аммония молибдата; в течение 1 ч не должен образовываться желтый осадок.

ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России Электронная библиотека

Сульфиты и другие восстанавливающие вещества. 1 г субстанции смешивают с 10 мл воды, прибавляют 1 мл серной кислоты разведенной 16 % и 0,1 мл 0,1 % раствора калия перманганата; в течение 10 мин не должно наблюдаться обесцвечивание раствора.

Тяжелые металлы. Не более 0,001% (ОФС «Тяжёлые металлы»). Для анализа отбирают 10 мл фильтрата, полученного в испытании «Кислоторастворимые вещества».

Мышьяк. Не более 0,00005 % с использованием 1 г субстанции (ОФС «Мышьяк»).

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

Количественное определение. Около 2 г (точная навеска) субстанции кипятят при перемешивании со 100 мл хлористоводородной кислоты 25 % в течение 15 мин. Осадок количественно переносят на двойной фильтр «синяя лента» и промывают горячей водой до отрицательной реакции на хлориды. Фильтр с осадком переносят во взвешенный тигель, осторожно озоляют, прокаливают при температуре 800 – 850 °С до постоянной массы и взвешивают. Масса должна составить не менее 97,5 % от исходной.

Хранение. В хорошо укупоренной упаковке.

Федеральный электронный медицинский библиотека

Борная кислота	**ФС.2.2.0002.15**
Борная кислота	**Взамен ГФ X, ст. 10;**
Acidum boricum	**Взамен ФС 42-3683-98**

Ортоборная кислота

H_3BO_3 М. м. 61,83

Содержит не менее 99,0 % борной кислоты H_3BO_3.

Описание. Белый или почти белый кристаллический порошок, бесцветные блестящие жирные на ощупь пластинки или белые или почти белые кристаллы.

Растворимость. Легко растворим в кипящей воде и глицерине 85 %, растворим в воде и спирте 96 %.

Подлинность. *1. Качественная реакция.* К 10 мл раствора, приготовленного в испытании на «Прозрачность» водного раствора, прибавляют 0,1 мл 0,05 % раствора метилового красного; должно появиться красно-оранжевое окрашивание.

2. Качественная реакция. 1,0 г субстанции растворяют в 10 мл кипящего спирта 96 %. К 3 мл полученного раствора прибавляют 1 мл серной кислоты концентрированной и перемешивают. При зажигании смесь должна гореть пламенем, окаймленным зеленым цветом.

pH. От 3,8 до 4,8 (3,3 % раствор, ОФС «Ионометрия», метод 3).

Сульфаты. Не более 0,045 % (ОФС «Сульфаты», метод 1). Определение проводят с использованием эталонного раствора, содержащего 9 мл стандартного раствора сульфат-иона (10 мкг/мл) и 1 мл воды. 5,0 г

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

субстанции растворяют в 20 мл кипящей воды. Раствор охлаждают, доводят объем раствора водой до 25 мл и фильтруют. 1 мл фильтрата разбавляют водой до 10 мл.

Тяжелые металлы. Не более 0,0015 % (ОФС «Тяжёлые металлы»). Определение проводят с эталонным раствором, содержащим 3 мл стандартного раствора свинец-иона (5 мкг/мл) и 7 мл воды. 5 мл фильтрата, полученного в испытании на «Сульфаты», разбавляют водой до 10 мл.

Органические примеси. Субстанция не должна темнеть при прокаливании при красном калении.

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

Количественное определение. К около 1 г (точная навеска) субстанции прибавляют 100 мл 20 % раствора маннита, предварительно нейтрализованного по фенолфталеину 0,1 М раствором натрия гидроксида, нагревают до полного растворения, охлаждают и титруют 1 М раствором натрия гидроксида с тем же индикатором до появления неисчезающего розового окрашивания.

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 1 М раствора натрия гидроксида соответствует 61,83 мг борной кислоты H_3BO_3.

Хранение. В хорошо укупоренной упаковке.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Вазелин	**ФС.2.2.0003.15**
Вазелин	**Взамен ГФ IX, ст. 746;**
Vaselinum	**взамен ФС 42-2456-97**

Описание. Однородная мазеобразная масса без запаха от белого до желтого цвета.

Подлинность. При намазывании на стеклянную пластинку образует ровную, несползающую пленку. При расплавлении дает прозрачную жидкость со слабым запахом парафина или нефти.

Растворимость. Умеренно растворим в хлороформе, практически не растворим в воде, спирте 96 %. Смешивается с жирными маслами.

Температура плавления. От 38 до 60 °С (ОФС «Температура плавления», метод 4).

Кинематическая вязкость. Не менее 16 сСт при 60 °С (ОФС «Вязкость»).

Плотность. От 0,815 до 0,880 г/см^3 (ОФС «Плотность», метод 2).

Кислотность или щелочность. 5 г субстанции расплавляют на водяной бане, тщательно перемешивают в течение 2 мин с 75 мл воды, предварительно подогретой до 80 – 95 °С. Смесь охлаждают и фильтруют. К 60 мл фильтрата прибавляют 0,25 мл 0,04 % раствора бромтимолового синего. Окраска раствора должна измениться от прибавления не более 0,15 мл 0,02 М раствора натрия гидроксида или 0,2 мл 0,02 М раствора хлористоводородной кислоты.

Сернистые соединения. К 3 г субстанции прибавляют 2 капли раствора свинца(II) ацетата основного, 2 мл спирта 96 % и нагревают при частом

взбалтывании на водяной бане при 70 °С в течение 10 мин. Смесь не должна темнеть.

Органические примеси. В фарфоровой чашке тщательно смешивают 3 г субстанции с 6 мл серной кислоты концентрированной; через 30 мин может появиться бурое, но не черное окрашивание.

Кислотное число. Не более 0,1 (ОФС «Кислотное число»).

Жиры и смолы. 10 г субстанции кипятят с 50 мл 20 % раствора натрия гидроксида в течение 30 мин при частом взбалтывании. Отделяют нижний (водный) слой, охлаждают и подкисляют кислотой хлористоводородной разведенной 8,3 %; не должно быть ни помутнения, ни осадка.

Восстанавливающие вещества. Определение проводят для субстанций, используемых для приготовления глазных мазей.

К 1 г субстанции прибавляют 5 мл воды, 2 мл серной кислоты разведенной 16 % и 0,1 мл 0,02 М раствора калия перманганата, нагревают при взбалтывании на кипящей водяной бане в течение 5 мин. Окраска водного слоя должна оставаться розовой.

Общая зола. Не более 0,05 % (ОФС «Зола общая»). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

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

Хранение. В защищённом от света месте.

Федеральная электронная медицинская библиотека

Масло вазелиновое **ФС.2.2.0004.15**

Парафин жидкий

Paraffinum liquidum **Взамен ГФ X, ст. 481**

Описание. Бесцветная маслянистая нефлуоресцирующая жидкость без запаха.

Растворимость. Растворимо в хлороформе, практически не растворимо в воде и спирте 96 %. Смешивается с растительными маслами, кроме касторового.

Подлинность. *1. ИК-спектр.* Инфракрасный спектр пленки субстанции между пластинками калия бромида, снятый в области частот от 4000 до 400 $см^{-1}$, по положению полос поглощения должен соответствовать рисунку спектра вазелинового масла (Приложение).

2. Качественная реакция. В пробирке осторожно кипятят 1 мл субстанции с 1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида при постоянном перемешивании в течение 30 с. При охлаждении до комнатной температуры образуются 2 слоя. К водному (нижнему) слою прибавляют 0,1 мл 1% раствора фенолфталеина. Должно появиться розовое окрашивание.

Плотность. От 0,850 до 0,890 $г/см^3$ (ОФС «Плотность»).

Температура затвердевания. Не выше −5 °С (ОФС «Температура затвердевания»).

Вязкость. От 26,0 до 38,5 сСт при 50 °С (ОФС «Вязкость»). Определение проводят на вискозиметре ВПЖ-2 с диаметром капилляра 0,99 мм, номинальным значением К 0,1 $мм^2/с$.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Вода, твердый парафин. При охлаждении субстанции до 0 °С в течение 4 ч допускается появление слабой опалесценции.

Органические примеси. 5 мл субстанции помещают в пробирку, прибавляют 5 мл серной кислоты концентрированной, нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 мин при частом взбалтывании и охлаждают на воздухе до полного разделения слоев.

Верхний слой должен быть бесцветным, допускается легкое помутнение. Нижний слой (слой серной кислоты) может быть окрашен в коричневый или темно-желтый цвет.

Кислотность или щелочность. 5 мл субстанции взбалтывают в течение 2 – 3 мин с 20 мл горячей воды. К 10 мл отделившегося водного слоя прибавляют 2 капли 1 % раствора фенолфталеина; раствор должен оставаться бесцветным.

Розовое окрашивание должно появиться от прибавления не более 0,05 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида.

Восстанавливающие вещества. К 10 мл субстанции прибавляют 0,5 мл 0,1 % раствора калия перманганата и нагревают на кипящей водяной бане в течение 5 мин при взбалтывании. Розовая окраска не должна исчезнуть.

Сульфиды. Смесь 3 мл субстанции с 0,1 мл 10 % раствора свинца(II) ацетата и 2 мл этанола не должна темнеть при нагревании до 70 °С на водяной бане в течение 10 мин.

Низкокипящие соединения. 100 мл субстанции помещают в колбу для перегонки так, чтобы шарик термометра был полностью погружен в жидкость, и нагревают до 360 °С; должно отгоняться не более 0,2 мл.

Общая зола. Не более 0,001 % (ОФС «Зола общая»). Для определения используют около 5,0 г (точная навеска) субстанции.

Полициклические ароматические углеводороды

Гексан, обработанный диметилсульфоксидом. 60 мл гексана помещают в делительную воронку с несмазанной запорной частью,

прибавляют 12 мл диметилсульфоксида и встряхивают. После разделения слоев отделяют нижний слой и отбрасывают, а верхний слой обрабатывают еще раз диметилсульфоксидом и повторно отбрасывают нижний слой после разделения.

Испытуемый раствор. 25 мл субстанции помещают в делительную воронку с несмазанной запорной частью, прибавляют 25 мл гексана, обработанного диметилсульфоксидом, перемешивают и прибавляют 5 мл диметилсульфоксида, встряхивают в течение 1 мин и дают отстояться до образования 2 четких слоев. Нижний слой переносят в другую делительную воронку, прибавляют 2 мл гексана, обработанного диметилсульфоксидом, и встряхивают. После разделения слоев отделяют и используют нижний слой.

Контрольный раствор. 0,0700 г нафталина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 60 мл триметилпентана, доводят раствор триметилпентаном до метки и перемешивают (раствор А).

Срок годности раствора А 6 мес.

1 мл раствора А переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объём раствора триметилпентаном до метки и перемешивают.

Срок годности контрольного раствора 1 мес.

Снимают спектр поглощения испытуемого раствора в области от 260 до 420 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм и измеряют оптическую плотность контрольного раствора при длине волны 275 нм.

В качестве раствора сравнения для испытуемого раствора используют прозрачный нижний слой, полученный при энергичном встряхивании 5 мл диметилсульфоксида с 25 мл гексана, обработанного диметилсульфоксидом, в течение 1 мин. В качестве раствора сравнения для контрольного раствора используют триметилпентан.

Оптическая плотность испытуемого раствора в области от 260 до 420 нм не должна превышать 1/3 от оптической плотности контрольного раствора при длине волны 275 нм.

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС

«Микробиологическая чистота».

Хранение. В хорошо укупоренной упаковке, в защищенном от света месте.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Водорода пероксид	**ФС.2.2.0005.15**
Водорода пероксид	
Hydrogenii peroxidum	**Взамен ГФ IX, ст. 495**

Пероксид водорода

H_2O_2 М. м. 34,01

Субстанция содержит не менее 30,0 % и не более 40,0 % водорода пероксида H_2O_2.

Описание. Бесцветная прозрачная жидкость.

Подлинность. *1. Качественная реакция.* К 1 мл субстанции прибавляют 0,2 мл серной кислоты разведенной 16 % и 0,25 мл 0,02 М раствора калия перманганата; раствор должен постепенно обесцветиться с выделением газа.

2. *Качественная реакция.* К 0,1 мл субстанции прибавляют 0,2 мл серной кислоты разведенной 16 %, 2 мл эфира, 0,2 мл 5 % раствора калия дихромата и взбалтывают; эфирный слой должен окраситься в синий цвет.

Кислотность. К 10 мл субстанции прибавляют 100 мл воды и 0,25 мл 0,05 % раствора метилового красного. Цвет раствора должен измениться от прибавления не более 0,7 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида.

Нелетучие вещества. Не более 0,06 %.

В платиновую чашку, высушенную до постоянной массы, помещают 50 мл воды и 10,0 мл субстанции. После окончания интенсивного разложения водорода пероксида (по прекращению выделения пузырьков

ФГБУ ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

газа) чашку помещают на кипящую водяную баню, выпаривают досуха и высушивают в сушильном шкафу при температуре 105 – 110 °С до постоянной массы.

Тяжелые металлы. Не более 0,0005 % (ОФС «Тяжёлые металлы»).

Испытуемый раствор. К 20 мл субстанции прибавляют 2 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 % и выпаривают на водяной бане почти досуха. Остаток разбавляют водой до 10 мл (раствор А). 1 мл раствора А разбавляют водой до 10 мл.

Количественное определение. Около 1,0 г (точная навеска) субстанции (точная навеска) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. К 10,0 мл полученного раствора прибавляют 5 мл серной кислоты разведенной 16 % и титруют 0,02 М раствором калия перманганата до слабо розового окрашивания.

Параллельно проводят контрольный опыт.

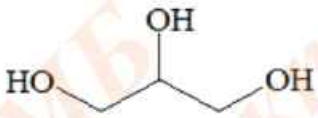
1 мл 0,02 М раствора калия перманганата соответствует 1,701 мг H_2O_2.

Хранение. В плотно укупоренной упаковке, в защищенном от света месте, при температуре не выше 15 °С.

Федеральный электронный медицинский библиотека

Глицерин	**ФС.2.2.0006.15**
Глицерин	
Glycerolum	**Взамен ФС 42-2202-99**

Пропан-1,2,3-триол



$C_3H_8O_3$ М. м. 92,09

Содержит не менее 98,0 % и не более 101,0 % глицерина $C_3H_8O_3$ в пересчете на безводное вещество.

Описание. Прозрачная, бесцветная или почти бесцветная, сиропообразная жидкость без запаха. Гигроскопичен.

Растворимость. Смешивается с водой и спиртом 96 %, мало растворим в ацетоне, практически не растворим в жирных маслах.

Подлинность

1. ИК-спектр. Инфракрасный спектр жидкой пленки субстанции, снятый между пластинками калия бромида, в области частот от 4000 до 400 $см^{-1}$, по положению полос поглощения должен соответствовать рисунку спектра глицерина (Приложение).

2. Качественная реакция. 0,5 мл субстанции нагревают под тягой с 1 г калия гидросульфата. Выделяющийся акролеин обнаруживают по

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

почернению фильтровальной бумаги, пропитанной щелочным раствором калия тетрайодомеркурата(II).

3. Качественная реакция. К 1 мл субстанции прибавляют 0,5 мл азотной кислоты концентрированной и перемешивают; прибавляют 0,5 мл 10,6 % раствора калия дихромата. На границе раздела жидкостей образуется кольцо синего цвета; синяя окраска не должна диффундировать в нижний слой в течение 10 мин.

Плотность. Не менее 1,244 г/см^3 (ОФС «Плотность»).

***Прозрачность раствора.** 50 г субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой, свободной от углерода диоксида, до метки; раствор должен быть прозрачным.

***Цветность раствора.** К 10 мл раствора, полученного в испытании на «Прозрачность раствора», прибавляют 25 мл воды; раствор должен быть бесцветным.

Кислотность или щелочность. К 50 мл раствора, полученного в испытании «Прозрачность раствора», прибавляют 0,5 мл 0,1 % раствора фенолфталеина; раствор должен быть бесцветным. Розовое окрашивание должно появиться при прибавлении не более 0,2 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида.

Родственные примеси. Определение проводят методом газовой хроматографии (ГХ).

Испытуемый раствор. 10,0 мл раствора, полученного в испытании на «Прозрачность раствора», помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Раствор сравнения А. 10,0 г стандартного образца субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 20 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 10,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Федеральная электронная медицинская библиотека ЭЭМБ

Раствор сравнения B. 0,200 г диэтиленгликоля помещают в мерную колбу вместимостью 20 мл, растворяют в небольшом количестве воды, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Раствор сравнения C. 1,0 мл раствора сравнения *B* помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора раствором сравнения *A* до метки и перемешивают. 1,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 20 мл, доводят объем раствора раствором сравнения *A* до метки и перемешивают.

Раствор сравнения D. 5,0 мл раствора сравнения *B* помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Раствор для проверки пригодности хроматографической системы. 1,0 мл испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 5,0 мл раствора сравнения *B*, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 1,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Хроматографические условия

Колонка	капиллярная;
Размеры	длина 30 м, диаметр 0,53 мм;
Неподвижная фаза	полицианопропилфенилсилоксан – полидиметилсилоксан (6:94);
Детектор	пламенно-ионизационный;
Газ носитель	гелий;
Линейная скорость	38 см/с;
Деление потока	1:10;
Объем пробы	0,5 мкл.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Температура

	Время, мин	Температура, °С
Колонка	0 0 – 16 16 – 20	100 100 → 220 220
Инжектор		220
Детектор		250

Хроматографируют раствор для проверки пригодности хроматографической системы. Порядок выхода пиков: диэтиленгликоль, глицерин. Разрешение между пиками диэтиленгликоля и глицерина должно быть не менее 7.

Хроматографируют испытуемый раствор и растворы сравнения *C* и *D*. Площадь пика диэтиленгликоля на хроматограмме испытуемого раствора должна быть не более площади пика диэтиленгликоля на хроматограмме раствора сравнения *C* (не более 0,1 %); площадь пика любой другой примеси с временем удерживания меньшим, чем время удерживания глицерина, должна быть не более площади пика диэтиленгликоля на хроматограмме раствора сравнения *C* (не более 0,1 %). Сумма площадей пиков всех примесей с временем удерживания, превышающим время удерживания глицерина, не должна более чем в 5 раз превышать площадь пика диэтиленгликоля на хроматограмме раствора сравнения *C* (не более 0,5 %). Не учитывают пики, площадь которых составляет 0,05 % от площади пика диэтиленгликоля на хроматограмме раствора сравнения *D* (не более 0,05 %).

Альдегиды. Не более 0,001 %.

Испытуемый раствор. 7,5 мл раствора, полученного в испытании на «Прозрачность раствора», помещают в колбу с притертой стеклянной пробкой, прибавляют 7,5 мл воды и 1 мл 0,1 % раствора фуксина обесцвеченного. Закрывают колбу и оставляют на 1 ч при температуре 25 °С.

Раствор сравнения. К 7,5 мл 0,0005 % раствора формальдегида прибавляют те же количества реактивов и выдерживают в течение 1 ч в тех же условиях, что и при подготовке испытуемого раствора.

Раствор формальдегида 0,0005 %. 3,0 мл 35 % раствора формальдегида помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 200 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Оптическая плотность испытуемого раствора при длине волны 552 нм не должна превышать оптическую плотность раствора сравнения при той же длине волны. Результат теста считается недействительным, если раствор сравнения не окрашен в розовый цвет.

Эфиры. К конечному раствору, полученному в испытании на «Кислотность и щелочность раствора», прибавляют 10 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида. Полученный раствор кипятят с обратным холодильником в течение 5 мин и охлаждают. Прибавляют 0,5 мл 0,1 % раствора фенолфталеина и титруют 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты.

Окраска раствора должна изменяться от прибавления не менее 8 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты.

Галогенсодержащие соединения. Не более 0,0035 %.

К 10 мл раствора, полученного в испытании «Прозрачность раствора», прибавляют 1 мл 8,5 % раствора натрия гидроксида, 5 мл воды и 50 мг никель-алюминиевого сплава, свободного от галогенов. Нагревают на водяной бане в течение 10 мин, охлаждают и отфильтровывают. Колбу и фильтр ополаскивают водой до получения 25 мл фильтрата. К 5 мл фильтрата прибавляют 4 мл спирта 96 %, 2,5 мл воды, 0,5 мл азотной кислоты концентрированной и 0,05 мл 1,7 % раствора серебра нитрата, перемешивают и оставляют на 2 мин (испытуемый раствор).

Одновременно готовят раствор сравнения, прибавляя к 7 мл 0,0005 % раствора хлорид-иона , 4 мл спирта 96 %, 0,5 мл воды, 0,5 мл азотной кислоты концентрированной и 0,05 мл 1,7 % раствора серебра нитрата, перемешивают и оставляют на 2 мин.

Опалесценция испытуемого раствора должна быть не интенсивнее опалесценции раствора сравнения.

Раствор хлорид-иона 0,0005 %. 0,824 г натрия хлорида растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 1000 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 1,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Сахара. К 10 мл раствора, полученного в испытании «Прозрачность раствора», прибавляют 1 мл серной кислоты разведенной 9,8 % и нагревают на водяной бане в течение 5 мин. Прибавляют 3 мл 8,5 % раствора натрия гидроксида, приготовленного с использованием воды, свободной от углерода диоксида, и перемешивают. По каплям добавляют 1 мл свежеприготовленного 12,5 % раствора меди(II) сульфата. Раствор окрашивается в синий цвет. При дальнейшем нагревании раствора на водяной бане в течение 5 мин не должен появиться осадок, окраска раствора должна оставаться синей.

Вода. Не более 2,0 % (ОФС «Определение воды»). Определение проводят из точной навески около 1,0 г субстанции.

Хлориды. Не более 0,001 % (ОФС «Хлориды»). 20 г субстанции смешивают с 60 мл воды, доводят объем раствора водой до 100 мл и перемешивают.

Сульфаты. Не более 0,005 % (ОФС «Сульфаты»). Для определения используют раствор, полученный в испытании «Хлориды».

Тяжелые металлы. Не более 0,0005 % (ОФС «Тяжёлые металлы»). Для определения используют раствор, полученный в испытании «Хлориды».

Железо. Не более 0,0015 % (ОФС «Железо»). Для определения используют раствор полученный в испытании «Хлориды».

Мышьяк. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Мышьяк», метод 2, способ А.

Сульфатная зола. Не более 0,01 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют около 10,0 г (точная навеска) субстанции.

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

Количественное определение. К около 0,075 г (точная навеска) прибавляют 45 мл воды, 25 мл смеси 0,1 М раствора серной кислоты и 0,1 М раствора натрия перйодата (1:20) и перемешивают. Полученный раствор оставляют в защищенном от света месте на 15 мин. Затем прибавляют 5 мл 50 % раствора этиленгликоля, перемешивают, оставляют в защищенном от света месте на 20 мин и титруют 0,1 М раствором натрия гидроксида (индикатор – 0,5 мл 0,1 % раствора фенолфталеина).

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида соответствует 9,209 мг глицерина $C_3H_8O_3$.

Хранение. В плотно укупоренной упаковке.

*Контроль по показателям качества «Прозрачность раствора» и «Цветность раствора» проводят в субстанции, предназначенной для производства лекарственных препаратов для парентерального применения.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Йод **ФС.2.2.0007.15**

Йод

Iodum **Взамен ГФ X, ст. 354**

Йод

I_2 М. м. 253,81

Содержит не менее 99,5 % йода I_2.

Описание. Серовато-черные с металлическим блеском пластинки, сростки кристаллов, куски. Летуч при температуре 20 °С. Возгоняется при нагревании, образуя фиолетовые пары.

Растворимость. Растворим в спирте 96 % и хлороформе, очень мало растворим в воде.

Подлинность. *1. Качественная реакция.* 0,2 г субстанции нагревают в пробирке, образуются фиолетовые пары, йод конденсируется на стенках.

2. Качественная реакция. 0,5 г субстанции энергично взбалтывают в течение 1 мин со 100 мл воды. Полученный раствор должен окрашиваться в синий цвет при прибавлении одной капли раствора крахмала. При кипячении окраска исчезает и вновь появляется при охлаждении.

Йодистый циан. 0,75 г субстанции растирают с 30 мл воды и фильтруют. 10 мл фильтрата обесцвечивают раствором сернистой кислоты, прибавляют 1 каплю раствора железа(II) сульфата в серной кислоте, 1 каплю 3 % раствора железа(III) хлорида и 0,5 мл 10 % раствора натрия гидроксида. Смесь нагревают и подкисляют хлористоводородной кислотой разведённой 8,3 %, не должно появляться синее окрашивание.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Хлориды и бромиды. Не более 0,02 % (ОФС «Хлориды»). 0,5 г субстанции растирают с 20 мл воды и фильтруют. К 10 мл фильтрата прибавляют по каплям раствор сернистой кислоты до обесцвечивания, 1 мл раствора аммиака концентрированного 25 % и 4 мл 2 % раствора серебра нитрата, взбалтывают и фильтруют. Фильтрат разбавляют водой до 25 мл. Для анализа отбирают 10 мл полученного раствора и прибавляют 1,5 мл азотной кислоты.

Нелетучий остаток. Не более 0,05 %. 1 г субстанции нагревают в выпарительной чашке на водяной бане до прекращения выделения фиолетовых паров и сушат при температуре 100 – 105 °С до постоянной массы.

Количественное определение. Около 0,2 г (точная навеска) растёртой субстанции помещают в колбу с притёртой пробкой, в которой находится 10 мл 10 % раствора калия йодида, прибавляют 10 мл воды и титруют 0,1 М раствором натрия тиосульфата до обесцвечивания, используя в качестве индикатора 1 – 2 мл раствора крахмала.

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,1 М раствора натрия тиосульфата соответствует 12,69 мг йода I_2.

Хранение. В хорошо укупоренной упаковке, в прохладном, защищенном от света месте.

Федеральный электронный медицинский библиотека

Калия йодид	**ФС.2.2.0008.15**
Калия йодид	**Взамен ГФ X, ст. 364;**
Kalii iodidum	**взамен ФС 42-3805-99**

Йодид калия

KI М. м. 166,00

Содержит не менее 99,0 % калия йодида KI в пересчете на сухое вещество.

Описание. Бесцветные или белые кубические кристаллы или белый мелкокристаллический порошок. Гигроскопичен.

Растворимость. Очень легко растворим в воде, легко растворим в глицерине, растворим в спирте 96 %.

Подлинность. Субстанция дает характерные реакции на калий и йодиды (ОФС «Общие реакции на подлинность»).

Прозрачность раствора. Раствор 1 г субстанции в 10 мл воды, свободной от диоксида углерода, должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

Цветность раствора. Раствор, полученный в испытании «Прозрачность раствора», должен быть бесцветным (ОФС «Степень окраски жидкостей»).

Щелочность. К 12,5 мл раствора, полученного в испытании «Прозрачность раствора», прибавляют 0,1 мл 0,05 % раствора

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

бромтимолового синего. Цвет раствора должен измениться от прибавления не более 0,5 мл 0,01 М раствора хлористоводородной кислоты.

Сульфаты. Не более 0,015 % (ОФС «Сульфаты», метод 2). 1 г субстанции растворяют в 15 мл воды.

Примечание. Если после прибавления хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 % в анализируемом растворе появляется желтая окраска, для ее обесцвечивания прибавляют 0,05 – 0,10 мл 0,1 М раствора натрия тиосульфата; равный объем 0,1 М раствора натрия тиосульфата прибавляют в раствор сравнения.

Цианиды. 0,5 г субстанции растворяют в 5 мл воды, прибавляют 0,25 мл раствора железа(II) сульфата в серной кислоте, 0,1 мл 3 % раствора железа(III) хлорида, 1 мл 10 % раствора натрия гидроксида и нагревают. После подкисления хлористоводородной кислотой разведённой 8,3 % раствор не должен окрашиваться в синий цвет.

Примечание. *Приготовление раствора железа(II) сульфата в серной кислоте*. 3,0 г железа(II) сульфата растворяют в смеси 3 мл свежепрокипячённой и охлажденной воды и 3 мл серной кислоты разведенной 9,8 %.

Барий. 0,5 г субстанции растворяют в 10 мл воды, прибавляют 1 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 % и 1 мл серной кислоты разведенной 16 %; раствор должен оставаться прозрачным в течение 15 мин.

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Тяжёлые металлы»). 1 г субстанции растворяют в 10 мл воды.

Железо. Не более 0,002 % (ОФС «Железо», метод 2). 0,5 г субстанции растворяют в 10 мл воды.

Йодноватая кислота, тиосульфаты, сульфиты. 0,5 г субстанции растворяют в 10 мл свежепрокипяченной и охлажденной воды, прибавляют по 0,1 мл раствора крахмала и серной кислоты разведенной 16 %. В течение 30 с не должно появляться синее окрашивание, заметное при рассмотрении жидкости по оси пробирки. Синее окрашивание должно появиться от прибавления не более 1 капли 0,1 М раствора йода.

Нитраты. К 1 г субстанции прибавляют 5 мл 10 % раствора натрия гидроксида, 0,5 г цинковых и 0,5 г железных опилок и нагревают. Выделяющиеся пары не должны вызывать синего окрашивания влажной красной лакмусовой бумаги.

Мышьяк. Не более 0,0001 % (ОФС «Мышьяк»). Для определения используют 1,0 г субстанции.

Потеря в массе при высушивании. Не более 1,0% (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

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

Количественное определение. Около 0,3 г (точная навеска) субстанции, предварительно высушенной при температуре от 100 до 105 °С в течение 4 ч, растворяют в 30 мл воды, прибавляют 1,5 мл уксусной кислоты разведенной 30 % и титруют 0,1 М раствором серебра нитрата до перехода окраски осадка от желтой к розовой (индикатор – 0,3 мл 0,1 % раствора эозина Н).

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,1 М раствора серебра нитрата соответствует 16,60 мг калия йодида KI.

Хранение. В хорошо укупоренной упаковке, в защищенном от света месте.

Федеральная электронная медицинская библиотека

Калия хлорид **ФС.2.2.0009.15**

Калия хлорид

Kalii chloridum **Взамен ГФ X, ст. 362**

Хлорид калия

KCl М. м. 74,55

Содержит не менее 99,0 % калия хлорида KCl в пересчете на сухое вещество для субстанции, предназначенной для производства нестерильных лекарственных препаратов.

Содержит не менее 99,5 % калия хлорида KCl в пересчете на сухое вещество для субстанции, предназначенной для производства лекарственных препаратов для парентерального применения.

Описание. Белый кристаллический или гранулированный порошок или бесцветные кристаллы.

Растворимость. Легко растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 %.

Подлинность. 10,0 г субстанции растворяют в 100 мл воды; полученный раствор дает характерные реакции на калий и хлориды (ОФС «Общие реакции на подлинность»).

***Прозрачность раствора.** 10,0 г субстанции растворяют в 100 мл воды; полученный раствор должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

***Цветность раствора.** Раствор, приготовленный в испытании на «Прозрачность раствора», должен быть бесцветным (ОФС «Степень окраски жидкостей»).

Кислотность или щелочность. 10,0 г субстанции растворяют в 100 мл воды. К 50 мл этого раствора прибавляют 0,1 мл 0,05 % раствора бромтимолового синего. Окраска раствора должна измениться от прибавления не более 0,5 мл 0,01 М раствора натрия гидроксида или не более 0,5 мл 0,01 М раствора хлористоводородной кислоты.

Щелочноземельные металлы и магний. Не более 0,02 % в пересчете на кальций. К 200 мл воды прибавляют 0,1 г гидроксиламина гидрохлорида, 10 мл буферного раствора аммония хлорида pH 10,0, 1 мл 0,1 М раствора цинка сульфата и 150 мг индикаторной смеси эриохрома черного. Нагревают до температуры 40 °С. Титруют 0,01 М раствором натрия эдетата до перехода окраски из фиолетовой в синюю. К полученному раствору прибавляют 100 мл раствора, содержащего 10,0 г субстанции, и перемешивают. Если цвет раствора изменился на фиолетовый, то его титруют 0,01 М раствором натрия эдетата до появления синего окрашивания. На второе титрование должно пойти не более 5 мл 0,01 М раствора натрия эдетата.

Барий. К 5 мл раствора, приготовленного для испытания «Прозрачность раствора», прибавляют 5 мл воды и 2 мл раствора серной кислоты разведенной 9,8 % и перемешивают. Через 2 ч мутность полученного раствора не должна превышать мутность эталонного раствора, содержащего 5 мл раствора, приготовленного для испытания «Прозрачность раствора», и 7 мл воды.

Железо. Не более 0,002 % (ОФС «Железо», метод 2). 10,0 г субстанции растворяют в 100 мл воды. К 5 мл этого раствора прибавляют 5 мл воды.

Мышьяк. Не более 0,0001 % (ОФС «Мышьяк»). Для определения используют 1,0 г субстанции и эталонного раствора, содержащего 1 мл стандартного раствора мышьяк-иона (1 мкг/мл).

Сульфаты. Не более 0,03 % (ОФС «Сульфаты», метод 2). 5 мл раствора, приготовленного в испытании «Прозрачность раствора», разводят водой до 15 мл.

Бромиды. Не более 0,1 %. 10,0 г субстанции растворяют в 100 мл воды. 1,0 мл этого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

К 5,0 мл полученного раствора прибавляют 2,0 мл 1,65 % раствора фенолового красного и 1 мл 0,01 % раствора хлорамина Т и тотчас перемешивают. Точно через 2 мин прибавляют 0,15 мл 0,1 М раствора натрия тиосульфата, перемешивают, доводят объем раствора водой до 10 мл, перемешивают и определяют оптическую плотность раствора на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 590 нм, используя воду в качестве раствора сравнения.

Оптическая плотность полученного раствора не должна превышать оптическую плотность эталонного раствора, приготовленного таким же образом, но с использованием 5 мл 0,3 % раствора калия бромида вместо испытуемого раствора.

Йодиды. 5 г субстанции увлажняют по каплям свежеприготовленной смесью, состоящей из 0,15 мл 10 % раствора натрия нитрита, 2 мл 0,5 М раствора серной кислоты, 25 мл 1 % раствора крахмала и 25 мл воды. Через 5 мин увлажненную субстанцию просматривают при дневном освещении: голубое окрашивание должно отсутствовать.

****Алюминий.** Не более 0,0001 % (ОФС Алюминий).

***Метод 1**. *Испытуемый раствор*. 4,0 г субстанции растворяют в 100 мл воды, прибавляют 10 мл ацетатного буферного раствора, pH 6,0 и перемешивают.

Эталонный раствор. К 2 мл стандартного раствора алюминий-иона (2 мкг/мл) прибавляют 10 мл ацетатного буферного раствора, pH 6,0 и 98 мл воды и перемешивают.

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

Контрольный раствор. К 10 мл ацетатного буферного раствора, pH 6,0 прибавляют 100 мл воды и перемешивают.

Метод 2. Определение проводят из навески субстанции 2,0 г.

***Натрий.** Не более 0,1 %. АЭС или ААС.

Стандартный раствор 200 мкг/мл натрий-иона. 0,5084 г натрия хлорида, высушенного при температуре 100 – 105 ºС до постоянной массы, помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Испытуемый раствор. 1,00 г субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Стандартный и испытуемый растворы разбавляют в соответствии с инструкцией к прибору и проводят определение содержания ионов натрия методом атомной эмиссии (метод прямой калибровки) или атомной абсорбции при длине волны 589 нм.

***Аммоний.** Не более 0,004 % (ОФС «Аммоний»). Для определения используют раствор 0,5 г субстанции в 10 мл воды.

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Тяжёлые металлы»). Для определения используют раствор, приготовленный в испытании «Прозрачность раствора».

Потеря в массе при высушивании. Не более 1,0 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

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

***Бактериальные эндотоксины.** Не более 0,12 ЕЭ на 1 мг калия хлорида (ОФС «Бактериальные эндотоксины»).

Для проведения испытания готовят исходный раствор субстанции 5 мг/мл, который затем разбавляют не менее чем в 2 раза.

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

Количественное определение. Около 0,05 г (точная навеска) субстанции растворяют в 50 мл (при потенциометрическом титровании) или 20 мл воды (при определении конечной точки титрования с помощью индикатора) и титруют 0,1 М раствором серебра нитрата потенциометрически или до оранжево-желтого окрашивания (индикатор – 5 % раствор калия хромата).

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,1 М раствора серебра нитрата соответствует 7,455 мг калия хорида KCl.

Хранение. В хорошо укупоренной упаковке.

*Контроль по показателям качества «Прозрачность раствора», «Цветность раствора», «Натрий», «Аммоний» и «Бактериальные эндотоксины» проводят в субстанциях, предназначенных для производства лекарственных препаратов для парентерального применения.

**Контроль по показателю качества «Алюминий» проводят в субстанциях, предназначенных для производства лекарственных препаратов для гемодиализа.

Федеральная электронная медицинская библиотека

Магния сульфат	**ФС.2.2.0010.15**
Магния сульфат	**Взамен ГФ X, ст. 383;**
Magnesii sulfas	**взамен ГФ XII, ч.1, ФС 42-0253-07**

Сульфат магния, гептагидрат

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$

М.м. 246,48

Содержит не менее 99,0 % и не более 101,0 % магния сульфата $MgSO_4 \cdot 7H_2O$.

Описание. Белый или почти белый кристаллический порошок или бесцветные призматические кристаллы.

Растворимость. Очень легко растворим в кипящей воде, легко растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 %.

Подлинность. Препарат дает характерные реакции на магний и сульфаты (ОФС «Общие реакции на подлинность»).

***Прозрачность раствора**. 2 г субстанции растворяют в воде и разбавляют водой до 20 мл; полученный раствор должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

***Цветность раствора**. Раствор, полученный в испытании на «Прозрачность раствора», должен быть бесцветным (ОФС «Степень окраски жидкостей»).

Кислотность или щелочность. К 5 мл раствора, полученного в испытании на «Прозрачность раствора», прибавляют 5 мл воды и 0,05 мл 1 % рас-

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

твора фенолфталеина; раствор должен быть бесцветным. Розовое окрашивание должно появляться от прибавления не более 0,1 мл 0,01 М раствора натрия гидроксида.

Хлориды. Не более 0,004 % (ОФС «Хлориды»). К 5 мл раствора, полученного в испытании «Прозрачность раствора», прибавляют 5 мл воды.

Тяжелые металлы. Не более 0,0005 % (ОФС «Тяжёлые металлы»). Для определения используют 10 мл раствора, полученного в испытании «Прозрачность раствора».

Железо. Не более 0,002 % (ОФС «Железо»). 1,5 г субстанции растворяют в воде и доводят водой до 10 мл.

Марганец. 1,25 г субстанции растворяют в 5 мл воды, прибавляют 0,5 мл серной кислоты концентрированной, 0,2 мл 0,1 М раствора серебра нитрата и нагревают до кипения. Прибавляют 2 мл 20 % раствора аммония персульфата и снова нагревают до кипения.

Проводят контрольный опыт с 5 мл воды и теми же реактивами.

Оба раствора охлаждают и переносят в одинаковые пробирки. В пробирку с контрольным опытом прибавляют из микробюретки 0,01 М раствор калия перманганата до тех пор, пока окраска не сравняется с окраской испытуемого раствора. Сравнение окрасок проводят на белом фоне по оси пробирок.

1 мл 0,01 М раствора калия перманганата соответствует 0,11 мг марганца, которого в субстанции должно быть не более 0,004 %.

Если субстанция предназначена для производства лекарственных препаратов для парентерального применения, используют раствор сравнения без добавления 0,01 М раствора калия перманганата; в такой субстанции марганца не должно быть.

Мышьяк. Не более 0,0002 % (ОФС «Мышьяк»). Для определения используют 0,25 г субстанции.

Потеря в массе при прокаливании. От 48,0 до 52,0 %. Около 1,0 г (точная навеска) субстанции сушат в течение 2,5 ч при температуре от 100 до

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

105 °С, а затем прокаливают при температуре красного каления до постоянной массы.

***Бактериальные эндотоксины.** Не более 0,07 ЕЭ на 1 мг магния сульфата (ОФС «Бактериальные эндотоксины»).

Для проведения испытания готовят исходный раствор субстанции (концентрация 250 мг/мл), затем разводят его не менее чем в 100 раз.

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

Количественное определение. Около 0,15 г субстанции (точная навеска) растворяют в 50 мл воды, прибавляют 5 мл аммиачного буферного раствора и титруют при энергичном перемешивании 0,05 М раствором натрия эдетата до появления синего окрашивания (индикатор – кислотный хром черный специальный).

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,05 М раствора натрия эдетата соответствует 12,32 мг магния сульфата $MgSO_4 \cdot 7H_2O$.

Хранение. В хорошо укупоренной упаковке.

*Контроль по показателям качества «Прозрачность раствора», «Цветность раствора», «Бактериальные эндотоксины» проводят в субстанциях, предназначенных для производства лекарственных препаратов для парентерального применения.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Натрия гидрокарбонат	**ФС.2.2.0011.15**
Натрия гидрокарбонат	
Natrii hydrocarbonas	**Взамен ГФ X, ст. 430**

Гидрокарбонат натрия

$NaHCO_3$ М. м. 84,01

Содержит не менее 99,0 % натрия гидрокарбоната $NaHCO_3$ в пересчете на сухое вещество.

Описание. Белый или почти белый кристаллический порошок без запаха.

Растворимость. Растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 %.

Подлинность. Субстанция дает характерные реакции на натрий (реакция А) и гидрокарбонаты (ОФС «Общие реакции на подлинность»).

***Прозрачность раствора.** 5 г субстанции растворяют в 100 мл воды, свободной от диоксида углерода (раствор *А*). Полученный раствор должен быть прозрачным для субстанции, предназначенной для производства стерильных лекарственных форм, или мутность раствора не должна превышать эталон II для субстанции, предназначенной для производства нестерильных лекарственных форм (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

***Цветность раствора.** Раствор, полученный в испытании «Прозрачность раствора», должен быть бесцветным (ОФС «Степень окраски жидкостей»).

Карбонаты. Значение pH свежеприготовленного раствора *A* должно быть не более 8,6 (ОФС «Ионометрия», метод 3).

Хлориды. Не более 0,015 % (ОФС «Хлориды»). К 7 мл раствора *A* прибавляют 2 мл азотной кислоты концентрированной и разводят полученный раствор до 15 мл водой.

Сульфаты. Не более 0,015 % (ОФС «Сульфаты»). 1,0 г субстанции суспендируют в 10 мл воды. К полученной смеси прибавляют хлористоводородную кислоту концентрированную до нейтральной реакции среды и 1 мл сверх того, и разводят полученный раствор до 15 мл водой.

Железо. Не более 0,005 % (ОФС «Железо»). 0,6 г субстанции растворяют в 10 мл воды.

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ОФС «Тяжёлые металлы»). 1,0 г субстанции растворяют в 10 мл воды.

Кальций. Не более 0,01 % (ОФС «Кальций»). 1,0 г субстанции суспендируют в 10 мл воды. К полученной смеси прибавляют хлористоводородную кислоту концентрированную до нейтральной реакции среды и разводят полученный раствор до 15 мл водой.

Аммоний. Не более 0,002 % (ОФС «Аммоний»). 1,0 г субстанции растворяют в 10 мл воды.

Мышьяк. Не более 0,0002 % (ОФС «Мышьяк»). Для определения используют 0,25 г субстанции.

Потеря в массе при высушивании. Не более 0,25 %. Около 4 г (точная навеска) субстанции сушат над силикагелем в течение 4 ч.

***Бактериальные эндотоксины.** Не более 0,04 ЕЭ на 1 мг субстанции (ОФС «Бактериальные эндотоксины»).

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

Количественное определение. Около 0,2 г (точная навеска) субстанции растворяют в 20 мл воды, свободной от углерода диоксида, и титруют 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты (индикатор – 0,1 мл 0,1 % спиртового раствора метилового оранжевого).

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты соответствует 8,401 мг натрия гидрокарбоната $NaHCO_3$.

Хранение. В хорошо укупоренной упаковке.

*Контроль по показателям качества «Прозрачность раствора», «Цветность раствора» и «Бактериальные эндотоксины» проводят в субстанциях, предназначенных для производства лекарственных препаратов для парентерального применения.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Натрия тетраборат	**ФС.2.2.0012.15**
Натрия тетраборат	
Natrii tetraboras	**Взамен ГФ X, ст. 440**

Тетраборат натрия, декагидрат

$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$

М. м. 381,37

Содержит не менее 99,0 % и не более 103,0 % натрия тетрабората $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$.

Описание. Белый кристаллический порошок или бесцветные кристаллы. Выветривается на воздухе.

Растворимость. Очень легко растворим в кипящей воде, легко растворим в глицерине 85 %, растворим в воде.

Подлинность. *1. Качественная реакция.* К 5 мл 4 % раствора прибавляют 0,1 мл 0,1 % раствора фенолфталеина; раствор окрашивается в красный цвет. При прибавлении 5 мл глицерина 85 % раствор должен обесцветиться.

2. Качественная реакция. К 0,2 г субстанции прибавляют 1 мл серной кислоты концентрированной, 3 мл спирта 96 % и перемешивают. При зажигании смесь должна гореть пламенем, окаймлённым зеленым цветом.

3. Качественная реакция. 4 % раствор должен давать характерную реакцию А на натрий (ОФС «Общие реакции на подлинность»).

pH. От 9,0 до 9,6 (4 % раствор, ОФС «Ионометрия», метод 3).

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Сульфаты. Не более 0,005 % (ОФС «Сульфаты», метод 2). Определение проводят с использованием эталонного раствора, содержащего 3 мл стандартного раствора сульфат-иона (10 мкг/мл) и 12 мл воды. Для анализа используют 15 мл 4% раствора.

Карбонаты. 0,25 г субстанции растворяют в 5 мл воды и прибавляют 1 мл 3 М раствора хлористоводородной кислоты; не должно наблюдаться выделения пузырьков газа.

Кальций. Не более 0,01 % (ОФС «Кальций», метод 2). Определение проводят с использованием эталонного раствора, содержащего 6 мл стандартного раствора кальций-иона (10 мкг/мл), 1 мл уксусной кислоты разведенной 12 % и 9 мл воды. Для анализа отбирают 15 мл 4 % раствора.

Аммоний. Не более 0,001% (ОФС «Аммоний»). Определение проводят с использованием эталонного раствора, содержащего 2 мл стандартного раствора аммоний-иона (2 мкг/мл) и 8 мл воды. Для анализа отбирают 10 мл 4 % раствора.

Железо. Не более 0,004 % (ОФС «Железо», метод 2). К 6 мл 4 % раствора прибавляют 4 мл воды и перемешивают.

Мышьяк. Не более 0,0005 % (ОФС «Мышьяк»). Для определения используют 1,0 г субстанции.

Тяжелые металлы. Не более 0,0025 % (ОФС «Тяжёлые металлы», метод 2). Для определения используют 10 мл 4 % раствора.

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

Количественное определение. Около 0,5 г (точная навеска) субстанции растворяют в 30 мл воды и титруют 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты до розово-оранжевого окрашивания (индикатор – 0,1 мл 0,1 % раствор метилового оранжевого).

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты соответствует 19,07 мг натрия тетрабората $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$.

Хранение. В хорошо укупоренной упаковке.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Натрия фторид	**ФС.2.2.0013.15**
Натрия фторид	
Natrii fluoridum	**Вводится впервые**

Фторид натрия

NaF М. м. 41,99

Содержит не менее 98,0 % и не более 102,0 % натрия фторида NaF в пересчете на сухое вещество.

Описание. Бесцветные кристаллы или белый, или почти белый кристаллический порошок.

Растворимость. Растворим или умеренно растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 %.

Подлинность *1. Качественная реакция.* 2,5 г субстанции растворяют в 100 мл воды (раствор *А*). К 2 мл раствора *А* прибавляют 0,5 мл 7,35 % раствора кальция хлорида. Образующийся белый желеобразный осадок растворяется при добавлении 5 мл 10,5 % раствора железа(III) хлорида.

2. Качественная реакция. К 1 мл раствора *А* прибавляют смесь 0,2 мл раствора ализаринового красного С и 0,2 мл 0,1 % раствора цирконила нитрата и перемешивают. Происходит изменение окраски от красной к желтой.

3. Качественная реакция. Субстанция дает характерную реакцию А на натрий (ОФС «Общие реакции на подлинность»).

Кислотность или щелочность. 2,5 г калия нитрата растворяют в 40 мл

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

раствора *А*, приготовленного в испытании «Подлинность», доводят объем раствора водой до 50 мл, охлаждают до 0 °С и прибавляют 0,2 мл 0,1 % раствора фенолфталеина.

Если раствор бесцветный, должно потребоваться не более 1,0 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида для получения стабильного в течение 15 с розового окрашивания.

Если раствор розовый, на его обесцвечивание должно потребоваться не более 0,25 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты.

Фторсиликаты. Раствор, нейтрализованный в результате испытания на кислотность или щелочность, нагревают до кипения. Горячий раствор титруют 0,1 М раствором натрия гидроксида. Стабильное розовое окрашивание раствора образуется при добавлении не более 0,75 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида.

Хлориды. Не более 0,02 % (ОФС «Хлориды»). К 4 мл раствора *А*, приготовленного в испытании «Подлинность», прибавляют 6 мл воды.

Сульфаты. Не более 0,02% (ОФС «Сульфаты»).

Испытуемый раствор. 10 мл раствора, полученного прибавлением 5 мл воды к раствору 0,25 г субстанции в 10 мл насыщенного раствора борной кислоты.

Эталонный раствор. 10 мл раствора, полученного прибавлением 10 мл насыщенного раствора борной кислоты к 5 мл стандартного раствора сульфат-иона (10 мкг/мл).

Потеря в массе при высушивании. Не более 0,5% (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции, температура высушивания – 130 °С.

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

Количественное определение. К 0,08 г субстанции (точная навеска) прибавляют смесь 5 мл уксусного ангидрида и 20 мл уксусной кислоты ледяной и нагревают до растворения. После охлаждения прибавляют 20 мл

диоксана. Титруют 0,1 М раствором хлорной кислоты до зеленого окрашивания (индикатор – 0,1 % раствор кристаллического фиолетового).

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,1 М раствора хлорной кислоты соответствует 4,199 мг натрия фторида NaF.

Хранение. В хорошо укупоренной упаковке.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Натрия хлорид	**ФС.2.2.0014.15**
Натрия хлорид	**Взамен ГФ X, ст. 426;**
Natrii chloridum	**взамен ФС 42-2572-95**

Хлорид натрия

NaCl М. м. 58,44

Содержит не менее 99,0 % натрия хлорида NaCl в пересчете на сухое вещество для субстанции, предназначенной для производства нестерильных лекарственных препаратов.

Содержит не менее 99,5 % натрия хлорида NaCl в пересчете на сухое вещество для субстанции, предназначенной для производства лекарственных препаратов для парентерального применения и глазных капель.

Описание. Белый кристаллический порошок или крупинки, или бесцветные кристаллы.

Растворимость. Легко растворим в воде, мало растворим в спирте 96 %.

Подлинность. Раствор 0,1 г субстанции в 2 мл воды должен давать характерную реакцию А на натрий и характерную реакцию на хлориды (ОФС «Общие реакции на подлинность»).

***Прозрачность раствора.** 20,0 г субстанции растворяют в свежепрокипяченной и охлажденной воде и разбавляют водой до 100 мл; полученный раствор должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

***Цветность раствора.** Раствор, полученный в испытании «Прозрачность раствора», должен быть бесцветным (ОФС «Степень окраски жидкостей»).

Кислотность или щелочность. К 20 мл раствора, приготовленного в испытании на «Прозрачность раствора», прибавляют 0,1 мл 0,05 % раствора бромтимолового синего. Окраска раствора должна измениться от прибавления не более 0,5 мл 0,01 М раствора натрия гидроксида или не более 0,5 мл 0,01 М раствора хлористоводородной кислоты.

Щелочноземельные металлы и магний. Не более 0,01 % в пересчете на кальций. К 200 мл воды прибавляют 0,1 г гидроксиламина гидрохлорида, 10 мл буферного раствора аммония хлорида, pH 10,0, 1 мл 0,1 М раствора цинка сульфата и 150 мг индикаторной смеси эриохрома черного Т. Нагревают до температуры 40 °С. Титруют 0,01 М раствором натрия эдетата до перехода окраски из фиолетовой в синюю. К полученному раствору прибавляют 100 мл раствора, содержащего 10,0 г субстанции, и перемешивают. Если цвет раствора изменился на фиолетовый, то его титруют 0,01 М раствором натрия эдетата до появления синего окрашивания. На второе титрование должно пойти не более 2,5 мл 0,01 М раствора натрия эдетата.

Барий. К 5 мл раствора, приготовленного в испытании на «Прозрачность раствора», прибавляют 5 мл воды, 2 мл раствора серной кислоты разведенной 9,8 % и перемешивают. Через 2 ч мутность полученного раствора не должна превышать мутность эталонного раствора, содержащего 5 мл раствора, приготовленного в испытании «Прозрачность раствора», и 7 мл воды.

Железо. Не более 0,0002 %. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Железо», метод 2, с использованием эталонного раствора, содержащего 4 мл стандартного раствора железо(III)-иона (1 мкг/мл) и 6 мл воды. Для анализа используют раствор, приготовленный в испытании «Прозрачность раствора».

Мышьяк. Не более 0,0001 % (ОФС «Мышьяк»). Определение проводят с использованием эталонного раствора, содержащего 1 мл стандартного раствора мышьяк-иона (1 мкг/мл). Для анализа отбирают 1,0 г субстанции.

Сульфаты. Не более 0,02 % (ОФС «Сульфаты», метод 2). 7,5 мл раствора, приготовленного в испытании «Прозрачность раствора», разводят водой до 30 мл.

Фосфаты. Не более 0,0025 % (ОФС «Фосфаты»). К 2 мл раствора, приготовленного для испытания «Прозрачность раствора», прибавляют 98 мл воды и перемешивают.

Ферроцианиды. К 2,0 г субстанции, растворенной в 6 мл воды, прибавляют 0,5 мл раствора, состоящего из 5 мл 1 % раствора железа(III) аммония сульфата в 2,5 % растворе серной кислоты, 95 мл 1 % раствора железа(II) сульфата, и перемешивают; в течение 10 мин не должно появляться синее окрашивание.

Нитриты. К 10 мл раствора, приготовленного в испытании «Прозрачность раствора», прибавляют 10 мл воды и перемешивают. Оптическая плотность полученного раствора, измеренная в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 354 нм относительно воды, должна быть не более 0,01.

Бромиды. Не более 0,01 %.

Испытуемый раствор. К 0,5 мл раствора, приготовленного в испытании «Прозрачность раствора», прибавляют 4 мл воды.

Эталонный раствор. 5 мл раствора калия бромида (3 мкг/мл).

К испытуемому и эталонному растворам прибавляют по 2,0 мл 1,65 % раствора фенолового красного, 1 мл 0,01 % раствора хлорамина Т и тотчас перемешивают. Точно через 2 мин прибавляют по 0,15 мл 0,1 М раствора натрия тиосульфата, перемешивают, доводят объемы растворов водой до 10 мл, перемешивают и измеряют оптическую плотность при 590 нм относительно воды.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Оптическая плотность испытуемого раствора не должна превышать оптическую плотность эталонного раствора.

Йодиды. 5 г субстанции увлажняют по каплям свежеприготовленной смесью, состоящей из 0,15 мл 10 % раствора натрия нитрита, 2 мл 0,5 М раствора серной кислоты, 25 мл 1 % раствора крахмала и 25 мл воды. Через 5 мин увлажненную субстанцию просматривают при дневном освещении – голубое окрашивание должно отсутствовать.

***Алюминий.** Не более 0,00002 % (ОФС «Алюминий», метод 1 или 2).

Метод 1.

Испытуемый раствор. 20,0 г субстанции растворяют в 100 мл воды, прибавляют 10 мл ацетатного буферного раствора, pH 6,0 и перемешивают.

Эталонный раствор. К 2 мл стандартного раствора алюминий-иона (2 мкг/мл) прибавляют 10 мл ацетатного буферного раствора, pH 6,0, 98 мл воды и перемешивают.

Контрольный раствор. К 10 мл ацетатного буферного раствора, pH 6,0 прибавляют 100 мл воды и перемешивают.

Метод 2. Определение проводят из навески субстанции 10,0 г.

***Калий.** Не более 0,05 %. Испытание проводят одним из методов.

Метод 1.

Стандартный раствор 20 мкг/мл калий-иона. 0,446 г калия сульфата, высушенного при температуре от 100 до 105 °С до постоянной массы, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Испытуемый раствор. 0,2 г субстанции растворяют в 10 мл воды.

Эталонный раствор. К 5 мл стандартного раствора калий-иона (20 мкг/мл) прибавляют 5 мл воды и перемешивают.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

К испытуемому и эталонному растворам прибавляют по 2 мл 1 % раствора натрия тетрафенилбората и перемешивают. Через 5 мин опалесценция испытуемого раствора не должна превышать опалесценцию эталонного раствора.

***Метод 2**. АЭС или ААС*

Стандартный раствор калий-иона (600 мкг/мл). 1,14 г калия хлорида, высушенного до постоянной массы при температуре 100 – 105 °С, помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Испытуемый раствор. 1,00 г субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Разбавление стандартного и испытуемого раствора производят в соответствии с инструкцией к прибору и проводят определение содержания ионов калия методом атомной эмиссии (метод прямой калибровки) или атомной абсорбции при длине волны 766,5 нм.

***Аммоний.** Не более 0,004 % (ОФС «Аммоний»). Определение проводят с использованием раствора 0,5 г субстанции в 10 мл воды.

Тяжелые металлы. Не более 0,0005 % (ОФС «Тяжёлые металлы»). Для определения используют раствор, приготовленный в испытании «Прозрачность раствора».

Потеря в массе при высушивании. Не более 0,5 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

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

***Бактериальные эндотоксины.** Не более 5 ЕЭ на 1 г субстанции (ОФС «Бактериальные эндотоксины»).

Количественное определение. Около 0,1 г (точная навеска) субстанции растворяют в 50 мл (при определении конечной точки

титрования потенциометрически) или 20 мл воды (при определении конечной точки титрования с помощью индикатора) и титруют 0,1 М раствором серебра нитрата с потенциометрическим определением точки эквивалентности или до оранжево-желтого окрашивания (индикатор – 5 % раствор калия хромата).

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,1 М раствора серебра нитрата соответствует 5,844 мг натрия хлорида NaCl.

Хранение. В хорошо укупоренной упаковке.

* Контроль по показателям качества «Прозрачность раствора», «Цветность раствора», «Алюминий», «Калий», «Аммоний» и «Бактериальные эндотоксины» проводят для субстанции, предназначенной для приготовления лекарственных форм для парентерального применения.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Парафин твёрдый	**ФС.2.2.0015.15**
Парафин твёрдый	
Paraffinum solidum	**Взамен ГФ IX, ст. 365**

Смесь твёрдых насыщенных углеводородов

Настоящая фармакопейная статья распространяется на парафин твердый – очищенную смесь твердых насыщенных углеводородов, в основном полученных из нефти. Может содержать антиоксиданты.

Описание. Бесцветная, белая или почти белая масса.

Растворимость. Легко растворим в метиленхлориде, практически нерастворим в воде и спирте 96 %.

Подлинность. *ИК-спектр.* Инфракрасный спектр расплавленной субстанции, снятый в тонком слое между пластинками из калия бромида, в области частот от 4000 до 400 $см^{-1}$ по положению полос поглощения должен соответствовать спектру стандартного образца парафина твердого.

Температура плавления. От 50 до 61 °С (ОФС «Температура плавления»).

Кислотность или щелочность. 15 г субстанции расплавляют на водяной бане, прибавляют 30 мл горячей воды, встряхивают в течение 1 мин. Охлаждают до комнатной температуры и фильтруют через бумажный фильтр, предварительно промытый горячей водой.

К 10 мл фильтрата прибавляют 0,1 мл 0,1 % раствора фенолфталеина; раствор должен быть бесцветным. Розовое окрашивание должно появляться

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

от прибавления не более 1 мл 0,01 М раствора натрия гидроксида.

К 10 мл фильтрата прибавляют 0,1 мл 0,05 % раствора метилового красного; желтый цвет раствора должен измениться на красный от прибавления не более 0,5 мл 0,01 М раствора хлористоводородной кислоты.

Сульфаты. Не более 0,015 % (ОФС «Сульфаты», метод 1). 2 г субстанции расплавляют на водяной бане, прибавляют 30 мл горячей воды, встряхивают в течение 1 мин. Охлаждают до комнатной температуры и фильтруют через бумажный фильтр, предварительно промытый горячей водой.

Легко обугливающиеся вещества

Испытуемая смесь. 5 мл парафина, нагретого на 5 °С выше температуры плавления, помещают в градуированную пробирку с притертой пробкой вместимостью 20 мл, прибавляют 5 мл серной кислоты концентрированной и нагревают на водяной бане при 70 °С в течение 10 мин. По истечении 5 мин и далее через каждую последующую минуту пробирку вынимают из водяной бани, 3 раза энергично встряхивают вертикально и помещают обратно на водяную баню, затратив на это не более 3 с.

Эталонная смесь. Смешивают 3 мл желтого раствора, 1,5 мл красного раствора и 0,50 мл голубого раствора в соответствии с требованиями ОФС «Степень окраски жидкостей». К полученному раствору прибавляют 5 мл вазелинового масла.

По истечении 10 мин после установки пробирки на водяную баню степень окраски кислоты в испытуемой смеси не должна превышать степень окраски нижнего слоя эталонной смеси.

Если в испытуемой смеси серная кислота остается в виде дисперсии, окраска испытуемой смеси не должна быть темнее, чем окраска эталонной смеси после энергичного встряхивания.

Полициклические ароматические углеводороды

Испытуемый раствор. 0,5 г субстанции помещают в делительную воронку с притертой пробкой вместимостью 125 мл, растворяют в 25 мл

гептана, прибавляют 5 мл диметилсульфоксида, встряхивают в течение 1 мин и оставляют до разделения слоев. Нижний слой переносят во вторую делительную воронку, прибавляют 2 мл гептана, встряхивают и оставляют до разделения слоев. Используют нижний слой.

Раствор сравнения. К 5 мл диметилсульфоксида прибавляют 25 мл гептана, встряхивают в течение 1 мин и оставляют до разделения слоев. Используют нижний слой.

Эталонный раствор. 0,07 г нафталина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 60 мл диметилсульфоксида, доводят объем раствора диметилсульфоксидом до метки и перемешивают. 1 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора диметилсульфоксидом до метки и перемешивают.

Регистрируют оптическую плотность испытуемого раствора в области от 265 до 420 нм относительно раствора сравнения.

Оптическая плотность испытуемого раствора в области длин волн от 265 до 420 нм не должна превышать 1/3 оптической плотности эталонного раствора, измеренной при длине волны 278 нм относительно диметилсульфоксида.

Хранение. В хорошо укупоренной упаковке, в защищенном от света месте.

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

Сера осажденная **ФС.2.2.0016.15**

Сера осажденная

Sulfur **Взамен ГФ X, ст. 644**

Сера

S А. м. 32,07

Содержит не менее 99,5 % серы S в пересчете на безводное вещество.

Описание. Очень мелкий порошок от светло-желтого до желтого цвета без запаха.

Растворимость. Растворим при кипячении в смеси 10 % раствора натрия гидроксида и спирта 96 % (20:25), мало растворим в растительных маслах при нагревании на водяной бане, практически нерастворим в воде.

Подлинность

1. Качественная реакция. Субстанция горит синим пламенем с выделением серы диоксида, который определяется по характерному запаху.

2. Качественная реакция. 0,1 г субстанции нагревают с 0,5 мл бромной воды до обесцвечивания, прибавляют 5 мл воды и фильтруют. Полученный раствор должен давать характерную реакцию на сульфаты (ОФС «Общие реакции на подлинность»).

Кислотность. 5 г субстанции взбалтывают в течение 5 мин с 30 мл свежепрокипяченной и охлажденной воды и фильтруют. Фильтрат должен окрашиваться в розовый цвет при прибавлении не более 0,2 мл 0,05 М раствора натрия гидроксида (индикатор – 1 % раствор фенолфталеина).

Сульфиды. 1 г субстанции взбалтывают с 40 мл воды, нагревают до 40

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

– 50 °С и фильтруют. Фильтрат не должен вызывать потемнения бумаги, смоченной 10 % раствором свинца ацетата.

Хлориды. Не более 0,008 % (ОФС «Хлориды»). Для определения используют фильтрат, полученный в испытании «Сульфиды», в объеме 10 мл.

Сульфаты. Не более 0,01 % (ОФС «Сульфаты»). 2 г субстанции взбалтывают с 20 мл воды, нагревают до 40 – 50 °С и фильтруют. Для анализа отбирают 10 мл фильтрата.

Мышьяк. Не более 0,0002% (ОФС «Мышьяк»). Определение проводят с использованием эталонного раствора, приготовленного из 1 мл стандартного раствора мышьяк-иона (1 мкг/мл). 1 г субстанции нагревают на водяной бане с 20 мл 10 % раствора аммиака до 35 – 40 °С, оставляют на 30 мин при той же температуре, часто взбалтывая, и после охлаждения фильтруют. Фильтрат выпаривают на водяной бане досуха. К остатку прибавляют 1 мл азотной кислоты, вновь выпаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 6 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 %. 3 мл полученного раствора переносят в прибор для определения мышьяка и прибавляют 25 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 %.

Селен. К 3 мл раствора, приготовленного в испытании «Мышьяк», прибавляют 5 мл раствора натрия гипофосфита и нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 мин; не должно быть покраснения раствора.

Вода. Не более 0,5 % (ОФС «Определение воды»). Для определения используют около 0,5 г (точная навеска) субстанции.

Общая зола. Не более 0,25 % (ОФС «Зола общая»). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

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

Количественное определение. Около 0,2 г (точная навеска) субстанции помещают в колбу вместимостью 200 – 250 мл, прибавляют 50 мл 0,5 М спиртового раствора калия гидроксида и 10 мл воды. Колбу

помещают на кипящую водяную баню и нагревают до растворения серы и полного удаления спирта. Затем прибавляют 40 мл воды, в горлышко колбы вставляют маленькую воронку и содержимое колбы кипятят в течение 10 мин. В горячий раствор осторожно (небольшими порциями) прибавляют при перемешивании 4 мл водорода пероксида до обесцвечивания раствора. После охлаждения жидкости воронку в колбе промывают водой, прибавляют 0,1 мл 0,1 % раствора метилового оранжевого и избыток калия гидроксида титруют 0,5 М раствором хлористоводородной кислоты.

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,5 М раствора калия гидроксида соответствует 8,017 мг серы S.

Хранение. В хорошо укупоренной упаковке.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Тальк **ФС.2.2.0017.15**

Тальк

Talcum **Взамен ФС 42-0066-01**

Магния силикат (3:4)

$3MgO \cdot 4SiO_2 \cdot H_2O$

$H_2Mg_3O_{12}Si_4$ М. м. 379,27

Тальк может содержать различные количества связанных минералов: хлориты (гидратированный алюминия и магния силикат), магнезиты (магния карбонат), кальциты (кальция карбонат) и доломиты (кальция и магния карбонат).

Тальк из месторождений, содержащих связанные асбесты, не должен использоваться для фармацевтических целей. Изготовитель талька несет ответственность за подтверждение отсутствия в тальке асбестов (амфиболов, серпентинов, тремолитов).

Присутствие амфиболов и серпентинов может быть обнаружено методами ИК-спектрометрии (метод 1) или дифрактометрии рентгеновского излучения (метод 2). Если одним из этих методов обнаружено наличие в тальке амфиболов и/или серпентинов, то изучение специфических морфологических характеристик проводят с помощью оптической микроскопии (метод 3).

Метод 1. *ИК-спектр.* Полоса поглощения в ИК-спектре субстанции в слое калия бромида при 758 $см^{-1}$ при расширении масштаба спектра свидетельствует о присутствии в тальке тремолита или хлорита. Если после прокаливания образца при 850 °С в течение 30 мин эта полоса поглощения не ис-

чезает, то в тальке присутствует тремолит. Любая полоса поглощения или плечо в ИК-спектре талька в области от 650 до 600 $см^{-1}$, обнаруживаемые после расширения масштаба спектра, свидетельствует о присутствии в нем серпентинов.

Метод 2. *Дифрактометрия рентгеновского излучения.* Для определения асбестов в тальке используют следующие условия получения дифрактограммы:

- Cu Kα монохроматическое излучение в режиме 40 кВ, 24 – 30 мА;
- входная щель 1 °;
- щель детектора 0,2 °;
- скорость углового сканирования 1/10 ° 2θ/мин;
- диапазон сканирования 10 − 13° и 24 − 26° 2θ;
- образец не ориентирован.

Образец помещают в держатель, разглаживают поверхность, накрывают полированным стеклянным предметным стеклом для микроскопии и регистрируют дифрактограмму.

Присутствие амфиболов определяют по наличию на дифрактограмме пиков в диапазоне (10,5 ± 0,1)° 2θ, а присутствие серпентинов – по наличию пиков в диапазоне от (24,3 ± 0,1)° 2θ до (12,1 ± 0,1)° 2θ.

Метод 3. *Микроскопия.* Если одним из методов 1 и 2 обнаружено наличие в тальке амфиболов и/или серпентинов, то дальнейшее исследование проводят методом оптической микроскопии для определения характеристик асбестов.

Следующие признаки служат доказательством наличия асбестов:

- для волокон длиной более 5 мкм отношения длины и ширины находятся в пределах от 20:1 до 100:1 или более;
- способность расщепляться на очень тонкие волокна;

и, если имеются, 2 из 4 указанных ниже признаков:

- параллельные волокна собраны в пучки;

Федеральный ЦНИИ Национальная электронная медицинская библиотека

– пучки волокон имеют ворсистые концы;

– волокна находятся в виде тонких игл;

– наблюдаются матовые массы отдельных волокон и/или волокон с изгибом.

Описание. Белый или почти белый легкий однородный порошок, жирный и скользкий на ощупь без твердых крупинок.

Растворимость. Практически нерастворим в воде, спирте 96 %, разбавленных растворах кислот и щелочей.

Подлинность

1. ИК-спектр. Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области от 4000 до 400 $см^{-1}$ должен иметь полосы поглощения при волновых числах 3677, 1018 и 669 $см^{-1}$.

2. Качественная реакция. 0,1 г субстанции сплавляют при температуре от 850 до 900 °С в платиновом тигле со смесью, состоящей из 0,2 г натрия карбоната безводного и 2 г калия карбоната. Сплаву дают остыть и переносят в выпарительную чашку при помощи 50 мл горячей воды. К сплаву осторожно прибавляют хлористоводородную кислоту разведённую 10 % до прекращения выделения пузырьков, затем прибавляют ещё 10 мл хлористоводородной кислоты разведенной 10 %. Полученный раствор упаривают на водяной бане досуха. К остатку прибавляют 20 мл воды, доводят до кипения и фильтруют через бумажный фильтр.

К 5 мл фильтрата прибавляют 1 мл 10 % раствора аммиака, 1 мл 10,7 % раствора аммония хлорида и фильтруют через бумажный фильтр. При прибавлении к полученному фильтрату 1 мл 9 % раствора динатрия гидрофосфата образуется белый кристаллический осадок (магний).

3. Качественная реакция. Осадок на фильтре помещают в платиновый тигель, прибавляют 10 мг натрия фторида и 0,2 мл серной кислоты концентрированной, накрывают тигель прозрачной плоской крышкой из пластика, на которую с внутренней стороны помещают каплю воды, и осторожно нагревают; вокруг капли образуется белое кольцо (кремний).

Вещества, растворимые в воде. Не более 0,2 %.

К 10 г субстанции прибавляют 50 мл воды, свободной от углерода диоксида, и кипятят с обратным холодильником в течение 30 мин. После охлаждения раствор фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора водой, свободной от углерода диоксида, до метки и перемешивают. 25 мл фильтрата выпаривают досуха, осадок высушивают в сушильном шкафу при температуре 105 ºС в течение 1 ч и взвешивают. Масса остатка не должна превышать 10 мг.

Кислотность. К 2,5 г субстанции прибавляют 50 мл воды, свободной от углерода диоксида, и кипятят с обратным холодильником в течение 30 мин. После охлаждения раствор фильтруют под вакуумом. К 10 мл фильтрата прибавляют 0,1 мл 0,04 % раствора бромтимолового синего; при добавлении не более 0,4 мл 0,01 М раствора хлористоводородной кислоты должно появиться зеленое окрашивание.

К 10 мл фильтрата прибавляют 0,1 мл 1 % раствора фенолфталеина; при добавлении не более 0,3 мл 0,01 М раствора натрия гидроксида должно появиться розовое окрашивание.

Свинец. Не более 0,001 %. Определение проводят методом атомной абсорбции.

Стандартный раствор свинец-иона (5 мкг/мл). См. ОФС «Тяжелые металлы».

Эталонные растворы свинец-иона для построения калибровочного графика (0,50; 0,75; 1,00; и 1,25 мкг/мл). 10, 15, 20 и 25 мл стандартного раствора свинец-иона (5 мкг/мл) помещают в мерные колбы вместимостью 100 мл, содержащие по 50 мл 0,5 М раствора хлористоводородной кислоты, доводят объемы растворов водой до метки и перемешивают. Растворы используют свежеприготовленными.

Испытуемый раствор. 10,0 г субстанции помещают в коническую колбу из термостойкого стекла, постепенно прибавляют при перемешивании 50 мл 0,5 М раствора хлористоводородной кислоты и нагревают с обратным

холодильником на кипящей водяной бане в течение 30 мин. После охлаждения и отстаивания раствор фильтруют через бумажный фильтр, собирая фильтрат в мерную колбу вместимостью 100 мл. Осадок промывают водой 3 раза порциями по 10 мл, затем 15 мл горячей воды. После охлаждения доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Измеряют поглощение эталонных и испытуемого растворов при длине волны 217,0 нм, используя воздушно-ацетиленовое пламя и лампу с полым свинцовым катодом в качестве источника излучения. Концентрацию свинца в испытуемом растворе находят по калибровочному графику, построенному по эталонным растворам свинец-иона.

Железо. Не более 0,25 %. Определение проводят методом атомной абсорбции.

Стандартный раствор железо(III)-иона (250 мкг/мл). 4,840 г железа(III) хлорида гексагидрата помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, содержащую 50 мл 15 % раствора хлористоводородной кислоты, растворяют, доводят объем раствора той же кислотой до метки и перемешивают. 5,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 200 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Эталонные растворы железо(III)-иона для построения калибровочного графика (5,0; 6,25; 7,5 и 10,0 мкг/мл). 2,0; 2,5; 3,0 и 4,0 мл стандартного раствора железо (Ш)-иона (250 мкг/мл) помещают в мерные колбы вместимостью 100 мл, содержащие по 50 мл 0,5 М раствора хлористоводородной кислоты, доводят объемы растворов водой до метки и перемешивают. Растворы используют свежеприготовленными.

Испытуемый раствор. 2,5 мл испытуемого раствора, приготовленного для испытания на свинец, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, содержащую 50 мл 0,5 М раствора хлористоводородной кислоты, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Измеряют поглощение эталонных и испытуемого растворов при длине

волны 248,3 нм, используя воздушно-ацетиленовое пламя, лампу с полым железным катодом в качестве источника излучения и дейтериевую лампу для коррекции. Концентрацию железа в испытуемом растворе находят по калибровочному графику, построенному по эталонным растворам железо(III)-иона.

Кальций. Не более 0,90 %. Определение проводят методом атомной абсорбции.

Раствор лантана(III) хлорида. К 58,65 г лантана(III) оксида медленно и осторожно прибавляют 100 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и нагревают до кипения. Затем раствор охлаждают, доводят объем раствора водой до 1000 мл и перемешивают.

Стандартный раствор кальций-иона (100 мкг/мл). 2,769 г кальция хлорида безводного помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в хлористоводородной кислоте разведенной 7,3 %, доводят объем раствора той же кислотой до метки и перемешивают. 10,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Эталонные растворы кальций-иона для построения калибровочного графика (1,0; 2,0; 3,0 и 4,0 мкг/мл). 1,0; 2,0; 3,0 и 4,0 мл стандартного раствора кальций-иона (100 мкг/мл) помещают в мерные колбы вместимостью 100 мл, содержащие по 10 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и 10 мл раствора лантана(III) хлорида, доводят объемы растворов водой до метки и перемешивают. Растворы используют свежеприготовленными.

Испытуемый раствор. 0,5 г субстанции помещают в тефлоновую чашку, прибавляют 5 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, 5 мл азотной кислоты, свободной от свинца, 5 мл хлорной кислоты и осторожно перемешивают. Затем прибавляют 35 мл фтористоводородной кислоты и медленно выпаривают досуха. К остатку прибавляют 5 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, накрывают чашку часовым стеклом и нагревают до кипения. После охлаждения часовое стекло и чашку промывают

водой, сливая полученный раствор в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (раствор *А*). 5,0 мл раствора *А* помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, 10 мл раствора лантана(III) хлорида, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Измеряют поглощение эталонных и испытуемого растворов при длине волны 422,7 нм, используя пламя закись азота – ацетилен и лампу с полым кальциевым катодом в качестве источника излучения. Концентрацию кальция в испытуемом растворе находят по калибровочному графику, построенному по эталонным растворам кальций-иона.

Магний. От 17,0 до 19,5 %. Определение проводят методом атомной абсорбции.

Раствор лантана(III) хлорида. См. раздел «Кальций».

Стандартный раствор магний-иона (10 мкг/мл). 8,365 г магния хлорида помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в хлористоводородной кислоте разведенной 7,3 %, доводят объем раствора той же кислотой до метки и перемешивают. 1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Стандартные растворы магний-иона для построения калибровочного графика (0,25; 0,3; 0,4 и 0,5 мкг/мл). 2,5; 3,0; 4,0 и 5,0 мл стандартного раствора магний-иона (10 мкг/мл) помещают в мерные колбы вместимостью 100 мл, содержащие по 10 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и 10 мл раствора лантана(III) хлорида, доводят объемы растворов водой до метки и перемешивают. Растворы используют свежеприготовленными.

Испытуемый раствор. 0,5 мл раствора *А*, приготовленного в испытании на «Кальций», помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 4,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, 10 мл раствора лантана(Ш)

хлорида, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Измеряют поглощение эталонных и испытуемого растворов при длине волны 285,2 нм, используя воздушно-ацетиленовое пламя и лампу с полым магниевым катодом в качестве источника излучения. Концентрацию магния в испытуемом растворе находят по калибровочному графику, построенному по эталонным растворам магний-иона.

Алюминий. Не более 2,0 %. Определение проводят методом атомной абсорбции.

Раствор цезия хлорида. 25,34 г цезия хлорида помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Стандартный раствор алюминий-иона (100 мкг/мл). См. ОФС «Алюминий».

Стандартные растворы алюминий-иона для построения калибровочного графика (5,0; 10,0; 15,0 и 20,0 мкг/мл). 5,0; 10,0; 15,0 и 20,0 мл стандартного раствора алюминий-иона (100 мкг/мл) помещают в мерные колбы вместимостью 100 мл, содержащие по 10 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и 10 мл раствора цезия хлорида, доводят объемы растворов водой до метки и перемешивают. Растворы используют свежеприготовленными.

Испытуемый раствор. 5,0 мл раствора *А*, приготовленного в испытании на «Кальций», помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, 10 мл раствора цезия хлорида, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Измеряют поглощение эталонных и испытуемого растворов при длине волны 309,3 нм, используя пламя закись азота – ацетилен и лампу с полым алюминиевым катодом в качестве источника излучения. Концентрацию алюминия в испытуемом растворе находят по калибровочному графику, построенному по эталонным растворам алюминий-иона.

Сернистые соединения. 0,6 г субстанции помещают в коническую колбу, прибавляют 100 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 %, на-

крывают колбу свинцово-ацетатной бумагой и кипятят в течение 1 ч; бумага не должна темнеть.

Мышьяк. Не более 0,0005 %. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Мышьяк». 1,5 г субстанции помещают в стакан, смачивают 3 мл спирта 96 %, прибавляют 10 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 %, 20 мл воды, нагревают на водяной бане при температуре от 40 до 50 °С в течение 15 мин и фильтруют через бумажный фильтр «синяя лента» в мерную колбу вместимостью 100 мл. Стакан и фильтр с остатком промывают горячей водой, собирая промывные воды в мерную колбу. После охлаждения доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Для анализа отбирают 6,7 мл полученного раствора.

Потеря в массе при прокаливании. Не более 7,0 %. Около 1,0 г (точная навеска) субстанции помещают в фарфоровый тигель, постепенно нагревают и прокаливают при температуре 1050 – 1100 °С до постоянной массы.

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

Хранение. В хорошо укупоренной упаковке.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Цинка оксид **ФС.2.2.0018.15**

Цинка оксид

Zinci oxidum **Взамен ГФ X, ст. 736**

Оксид цинка

ZnO М. м. 81,41

Содержит не менее 99,0 % цинка оксида ZnO в пересчете на прокаленное вещество.

Описание. Белый или белый с желтоватым оттенком аморфный порошок без запаха. Поглощает углерода диоксид воздуха.

Растворимость. Легко растворим в уксусной кислоте разведенной 30 %, растворим в разведенных минеральных кислотах, практически нерастворим в воде и спирте 96 %.

Подлинность

1. Качественная реакция. 0,05 г субстанции растворяют в 2 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 %, прибавляют 8 мл воды и перемешивают. Полученный раствор дает характерные реакции на цинк (ОФС «Общие реакции на подлинность»).

2. Качественная реакция. При прокаливании субстанция окрашивается в желтый цвет, а при охлаждении – снова белеет.

Щелочность. 1 г субстанции смешивают с 10 мл горячей воды, прибавляют 2 капли 1 % раствора фенолфталеина. При появлении розового окрашивания на обесцвечивание раствора должно расходоваться не более 0,3 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты.

Карбонаты и нерастворимые в кислотах примеси. К 0,5 г субстанции прибавляют 5 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 %; не должны выделяться пузырьки газа. Полученный раствор должен быть прозрачным и бесцветным.

Железо, медь и алюминий. К раствору, полученному в испытании на «Карбонаты и нерастворимые примеси», прибавляют 10 мл 10 % раствора аммиака; полученный раствор должен быть бесцветным и прозрачным.

Потеря в массе при прокаливании. Не более 1 %. Около 1,0 г (точная навеска) субстанции прокаливают до постоянной массы при 500 °С.

Свинец. 2 г субстанции растворяют в 25 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, прибавляют 5 капель 5 % раствора калия хромата. Полученный раствор должен оставаться прозрачным.

Мышьяк. Не более 0,0002 % (ОФС «Мышьяк»). Для определения используют 0,25 г субстанции.

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

Количественное определение. Около 0,7 г (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 50 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 %, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 10,0 мл полученного раствора переносят в колбу вместимостью 250 мл, нейтрализуют 10 % раствором аммиака в присутствии 1 капли 0,1 % спиртового раствора метилового красного, прибавляют 5 мл буферного раствора аммония хлорида, pH 10, 0,90 мл воды и титруют 0,05 М раствором натрия эдетата до синего окрашивания (индикатор – 0,1 г индикаторной смеси или 6 – 7 капель кислотного хром черного специального).

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,05 М раствора натрия эдетата соответствует 4,070 мг цинка оксида ZnO.

Хранение. В хорошо укупоренной упаковке.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Вода для инъекций	**ФС.2.2.0019.15**
Вода для инъекций	**Взамен ГФ X, ст. 74;**
Aqua per injectionis	**взамен ФС 42-2620-97**

H_2O М. м. 18,02

Настоящая фармакопейная статья распространяется на нефасованную воду для инъекций, получаемую из воды питьевой методами дистилляции, ионного обмена, обратного осмоса, комбинацией этих методов или другим способом, или из воды, очищенной методом дистилляции, и предназначенную для производства или изготовления парентеральных и других лекарственных средств.

При использовании воды для инъекций в технологии парентеральных и других лекарственных средств, получаемых непосредственно перед применением, в условиях, исключающих последующую стерилизацию лекарственных препаратов, вода для инъекций должна быть стерильной.

Вода для инъекций должна быть апирогенной и не должна содержать антимикробных консервантов или других добавок.

Описание. Бесцветная прозрачная жидкость без запаха.

pH. От 5,0 до 7,0 (ОФС «Ионометрия», метод 3). К 100 мл воды очищенной прибавляют 0,3 мл насыщенного раствора калия хлорида.

Кислотность или щелочность. К 20 мл воды для инъекций прибавляют 0,05 мл 0,1 % раствора фенолового красного. При появлении желтого окрашивания оно должно измениться на красное от прибавления не более 0,1 мл 0,01 М раствора натрия гидроксида. При появлении красного

окрашивания оно должно измениться на желтое от прибавления не более 0,15 мл 0,01 М раствора хлористоводородной кислоты.

Электропроводность. Определение проводят в соответствии с ОФС «Электропроводность» с помощью оборудования – кондуктометров, внесенных в Государственный реестр средств измерений.

Оборудование

Кондуктометрическая ячейка:

- *электроды из подходящего материала*, такого как нержавеющая сталь;

- *константа ячейки* обычно устанавливается поставщиком и впоследствии проверяется через соответствующие интервалы времени с использованием сертифицированного стандартного раствора с электропроводностью менее 1500 мкСм/см или путем сравнения с ячейкой, имеющей аттестованную константу ячейки. Константа ячейки считается подтвержденной, если найденное значение находится в пределах 2 % от значения, указанного в сертификате; в противном случае должна быть проведена повторная калибровка.

Кондуктометр. Точность измерения должна быть не менее 0,1 мкСм/см в низшем диапазоне.

Калибровка системы (ячейки электропроводности и кондуктометра). Калибровка должна проводиться с использованием одного или более соответствующих стандартных растворов (ОФС «Электропроводность»). Допустимое отклонение должно составлять не более 3 % от измеренного значения электропроводности.

Калибровка кондуктометра. Калибровку кондуктометра проводят с использованием сопротивлений высокой точности или эквивалентным прибором после отсоединения ячейки электропроводности для всех интервалов, использующихся для измерения электропроводности и калибровки ячейки, с погрешностью не более 0,1 % от сертифицированной величины.

В случае невозможности отсоединения ячейки электропроводности, вмонтированной в производственную линию, калибровка может быть проведена относительно предварительно калиброванной ячейки электропроводности, помещенной в поток воды рядом с калибруемой ячейкой.

Методика

Стадия 1

Измеряют электропроводность без температурной компенсации с одновременной регистрацией температуры. Измерение электропроводности с помощью кондуктометров с температурной компенсацией возможно только после соответствующей валидации.

Находят ближайшее значение температуры (табл. 1), меньше измеренного. Соответствующая величина электропроводности является предельно допустимой.

Вода для инъекций соответствует требованиям, если измеренное значение электропроводности не превышает найденного по табл. 1 предельно допустимого значения.

Таблица 1 – **Предельно допустимые значения электропроводности воды для инъекций в зависимости от температуры**

Температура, °С	Электропроводность, мкСм/см	Температура, °С	Электропроводность, мкСм/см
0	0,6	55	2,1
5	0,8	60	2,2
10	0,9	65	2,4
15	1,0	70	2,5
20	1,1	75	2,7
25	1,3	80	2,7
30	1,4	85	2,7
35	1,5	90	2,7
40	1,7	95	2,9
45	1,8	100	3,1
50	1,9		

Для значений температур, не представленных в табл. 1, рассчитывают максимально допустимое значение электропроводности путем интерполяции

ближайших к полученному верхнему и нижнему значениям, приведенным в табл. 1.

Если величина электропроводности превышает приведенное в табл. 1 значение, продолжают испытания в соответствии с требованиями стадии 2.

Стадия 2

Не менее 100 мл воды для инъекций помещают в сосуд и перемешивают. При постоянном перемешивании устанавливают температуру в пределах 25 ± 1 °С и измеряют электропроводность через каждые 5 мин до тех пор, пока изменение электропроводности за 5 мин не составит менее 0,1 мкСм/см. Фиксируют это значение электропроводности.

Вода для инъекций удовлетворяет требованиям, если полученное значение электропроводности составляет не более 2,1 мкСм/см.

Если значение электропроводности более 2,1 мкСм/см, проводят испытания в соответствии с требованиями стадии 3.

Стадия 3

Испытание выполняют в течение приблизительно 5 мин после проведения испытания по стадии 2, поддерживая температуру в пределах 25 ± 1 °С. Прибавляют свежеприготовленный насыщенный раствор калия хлорида к воде для инъекций (0,3 мл на 100 мл воды для инъекций) и определяют pH с точностью до 0,1.

Определяют предельное значение электропроводности (табл. 2) для данного pH.

Вода для инъекций удовлетворяет требованиям по электропроводности, если величина электропроводности, полученная на стадии 2, не превышает значения, приведенного в табл. 2. Если полученная на стадии 2 величина электропроводности превышает значение, приведенное в табл. 2, или значение pH находится за пределами диапазона 5,0–7,0, то вода для инъекций не соответствует требованиям по показателю «Электропроводность».

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Таблица 2 – **Предельно допустимые значения электропроводности воды для инъекций в зависимости от pH**

pH	Электропроводность, мкСм/см	pH	Электропроводность, мкСм/см
5,0	4,7	6,1	2,4
5,1	4,1	6,2	2,5
5,2	3,6	6,3	2,4
5,3	3,3	6,4	2,3
5,4	3,0	6,5	2,2
5,5	2,8	6,6	2,1
5,6	2,6	6,7	2,6
5,7	2,5	6,8	3,1
5,8	2,4	6,9	3,8
5,9	2,4	7,0	4,6
6,0	2,4		

Сухой остаток. Не более 0,001 %. 100 мл воды для инъекций выпаривают досуха и сушат при температуре от 100 до 105 °С до постоянной массы.

Восстанавливающие вещества. 100 мл воды для инъекций доводят до кипения, прибавляют 0,1 мл 0,02 М раствора калия перманганата и 2 мл серной кислоты разведенной 16 %, кипятят 10 мин; розовое окрашивание должно сохраниться.

Углерода диоксид. При взбалтывании воды для инъекций с равным объемом раствора кальция гидроксида (известковой воды) в наполненном доверху и хорошо закрытом сосуде не должно быть помутнения в течение 1 ч.

Нитраты и нитриты. К 5 мл воды для инъекций осторожно прибавляют 0,1 мл свежеприготовленного раствора дифениламина; не должно появляться голубое окрашивание.

Аммоний. Не более 0,00002 % (ОФС «Аммоний»). Определение проводят с использованием эталонного раствора, содержащего 1 мл стандартного раствора аммоний-иона (2 мкг/мл) и 9 мл воды, свободной от аммиака. Для определения отбирают 10 мл испытуемой пробы.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Примечание. Стандартный раствор аммоний-иона (2 мкг/мл) готовят разбавлением стандартного раствора аммоний-иона (200 мкг/мл) водой, свободной от аммиака.

Хлориды. К 10 мл воды для инъекций прибавляют 0,5 мл азотной кислоты, 0,5 мл 2 % раствора серебра нитрата, перемешивают и оставляют на 5 мин. Не должно быть опалесценции.

Сульфаты. К 10 мл воды для инъекций прибавляют 0,5 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 % и 0,1 мл 5 % раствора бария хлорида, перемешивают и оставляют на 10 мин. Не должно быть помутнения.

Кальций и магний. К 100 мл воды для инъекций прибавляют 2 мл буферного раствора аммония хлорида, pH 10,0, 50 мг индикаторной смеси протравного черного 11 и 0,5 мл 0,01 М раствора натрия эдетата; должно наблюдаться чисто синее окрашивание раствора (без фиолетового оттенка).

Алюминий. Не более 0,000001 % (ОФС «Алюминий», метод 1).

Испытуемый раствор. К 400 мл воды очищенной прибавляют 10 мл ацетатного буферного раствора, pH 6,0 и 100 мл воды дистиллированной, перемешивают.

Эталонный раствор. К 2 мл стандартного раствора алюминий-иона (2 мкг/мл) прибавляют 10 мл ацетатного буферного раствора, pH 6,0 и 98 мл воды дистиллированной, перемешивают.

Контрольный раствор. К 10 мл ацетатного буферного раствора, pH 6,0 прибавляют 100 мл воды дистиллированной и перемешивают.

Тяжелые металлы. Не более 0,00001 %.

Определение проводят одним из приведенных методов.

Метод 1. В пробирку диаметром около 1,5 см помещают 10 мл испытуемой воды для инъекций, прибавляют 1 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, 2 капли 2 % раствора натрия сульфида и перемешивают. Через 1 мин производят наблюдение окраски раствора по оси пробирки, помещенной на белую поверхность. Не должно быть окрашивания.

Метод 2. 120 мл воды для инъекций упаривают до объёма 20 мл. Оставшаяся после упаривания вода в объеме 10 мл должна выдерживать

испытание на тяжёлые металлы (ОФС «Тяжелые металлы») с использованием эталонного раствора, содержащего 1 мл стандартного раствора свинец-иона (5 мкг/мл) и 9 мл испытуемой воды для инъекций.

Примечание. Стандартный раствор свинец-иона (5 мкг/мл) готовят разбавлением стандартного раствора свинец-иона (100 мкг/мл) испытуемой водой для инъекций.

Микробиологическая чистота. Общее число аэробных микроорганизмов (бактерий и грибов) не более 10 КОЕ в 100 мл. Не допускается наличие *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa* в 100 мл.

Для анализа микробиологической чистоты воды для инъекций отбирают образец в объеме не менее 1000 мл.

Исследование проводят методом мембранной фильтрации в асептических условиях в соответствии с методами ОФС «Микробиологическая чистота», п.12.

Бактериальные эндотоксины. Менее 0,25 ЕЭ/мл (ОФС «Бактериальные эндотоксины»).

Хранение и распределение. Воду для инъекций хранят и распределяют в условиях, предотвращающих рост микроорганизмов и исключающих возможность любой другой контаминации.

Хранение воды для инъекций осуществляют в специальных сборниках при условии постоянной циркуляции при температуре не ниже 85 ºС, в течение не более 1 сут.

Федеральная электронная медицинская библиотека

Вода очищенная	**ФС.2.2.0020.15**
Вода очищенная	**Взамен ГФ X, ст. 73;**
Aqua purificata	**взамен ФС 42-2619-97**

H_2O М. м. 18,02

Настоящая фармакопейная статья распространяется на нефасованную воду очищенную, получаемую из воды питьевой методами дистилляции, ионного обмена, обратного осмоса, комбинацией этих методов или другим способом, и предназначенную для производства или изготовления лекарственных средств, получения воды для инъекций, а также для проведения испытаний лекарственных средств.

Для приготовления лекарственных средств, изготовляемых в асептических условиях, воду очищенную необходимо подвергать стерилизации.

Вода очищенная не должна содержать антимикробных консервантов или других добавок.

Описание. Бесцветная прозрачная жидкость без запаха.

pH. От 5,0 до 7,0 (ОФС «Ионометрия», метод 3). К 100 мл воды очищенной прибавляют 0,3 мл насыщенного раствора калия хлорида.

Кислотность или щелочность. К 20 мл воды очищенной прибавляют 0,05 мл 0,1 % раствора фенолового красного. При появлении желтого окрашивания оно должно измениться на красное при прибавлении не более

0,1 мл 0,01 М раствора натрия гидроксида. При появлении красного окрашивания оно должно измениться на желтое при прибавлении не более 0,15 мл 0,01 М раствора хлористоводородной кислоты.

Электропроводность. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Электропроводность» с помощью оборудования – кондуктометров, внесенных в Государственный реестр средств измерений.

Оборудование

Кондуктометрическая ячейка:

– *электроды из подходящего материала*, такого как нержавеющая сталь;

– *константа ячейки* обычно устанавливается поставщиком и впоследствии проверяется через соответствующие интервалы времени с использованием сертифицированного стандартного раствора с электропроводностью менее 1500 мкСм/см или путем сравнения с ячейкой, имеющей аттестованную константу ячейки. Константа ячейки считается подтвержденной, если найденное значение находится в пределах 2 % от значения, указанного в сертификате; в противном случае должна быть проведена повторная калибровка.

Кондуктометр. Точность измерения должна быть не менее 0,1 мкСм/см в низшем диапазоне.

Калибровка системы (ячейки электропроводности и кондуктометра). Калибровка должна проводиться с использованием одного или более соответствующих стандартных растворов (ОФС «Электропроводность»). Допустимое отклонение должно составлять не более 3 % от измеренного значения электропроводности.

Калибровка кондуктометра. Калибровку кондуктометра проводят с использованием сопротивлений высокой точности или эквивалентным прибором после отсоединения ячейки электропроводности для всех интервалов, использующихся для измерения электропроводности и

калибровки ячейки, с погрешностью не более 0,1 % от сертифицированной величины.

В случае невозможности отсоединения ячейки электропроводности, вмонтированной в производственную линию, калибровка может быть проведена относительно предварительно калиброванной ячейки электропроводности, помещенной в поток воды рядом с калибруемой ячейкой.

Методика

Измеряют электропроводность без температурной компенсации с одновременной регистрацией температуры. Измерение электропроводности с помощью кондуктометров с температурной компенсацией возможно только после соответствующей валидации.

В табл. 1 находят ближайшее значение температуры, меньше измеренного. Соответствующая величина электропроводности является предельно допустимой.

Вода очищенная соответствует требованиям, если измеренное значение электропроводности не превышает найденного по табл.1 предельно допустимого значения.

Таблица 1 – **Предельно допустимые значения электропроводности воды очищенной в зависимости от температуры**

Температура, °С	Электропроводность, мкСм/см	Температура, °С	Электропроводность, мкСм/см
0	2,4	60	8,1
10	3,6	70	9,1
20	4,3	75	9,7
25	5,1	80	9,7
30	5,4	90	9,7
40	6,5	100	10,2
50	7,1		

Для значений температур, не представленных в табл. 1, рассчитывают предельно допустимое значение электропроводности путем интерполяции

ближайших к полученному верхнему и нижнему значениям, приведенным в табл. 1.

Сухой остаток. Не более 0,001 %. 100 мл воды очищенной выпаривают досуха и сушат при температуре от 100 до 105 °С до постоянной массы.

Восстанавливающие вещества. 100 мл воды очищенной доводят до кипения, прибавляют 0,1 мл 0,02 М раствора калия перманганата и 2 мл серной кислоты разведенной 16 %, кипятят 10 мин; розовое окрашивание должно сохраниться.

Углерода диоксид. При взбалтывании воды очищенной с равным объемом раствора кальция гидроксида (известковой воды) в наполненном доверху и хорошо закрытом сосуде не должно быть помутнения в течение 1 ч.

Нитраты и нитриты. К 5 мл воды очищенной осторожно прибавляют 1 мл свежеприготовленного раствора дифениламина; не должно появляться голубое окрашивание.

Аммоний. Не более 0,00002 % (ОФС «Аммоний»). Определение проводят с использованием эталонного раствора, содержащего 1 мл стандартного раствора аммоний-иона (2 мкг/мл) и 9 мл воды, свободной от аммиака. Для определения отбирают 10 мл испытуемой пробы.

Примечание. Стандартный раствор аммоний-иона (2 мкг/мл) готовят разбавлением стандартного раствора аммоний-иона (200 мкг/мл) водой, свободной от аммиака.

Хлориды. К 10 мл воды очищенной прибавляют 0,5 мл азотной кислоты, 0,5 мл 2 % раствора серебра нитрата, перемешивают и оставляют на 5 мин. Не должно быть опалесценции.

Сульфаты. К 10 мл воды очищенной прибавляют 0,5 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 % и 1 мл 5 % раствора бария хлорида, перемешивают и оставляют на 10 мин. Не должно быть помутнения.

Кальций и магний. К 100 мл воды очищенной прибавляют 2 мл буферного раствора аммония хлорида, pH 10,0 50 мг индикаторной смеси

протравного черного 11 и 0,5 мл 0,01 М раствора натрия эдетата; должно наблюдаться чисто синее окрашивание раствора (без фиолетового оттенка).

Алюминий. Не более 0,000001 % (ОФС «Алюминий», метод 1). Испытание проводят для воды очищенной, предназначенной для использования в производстве растворов для диализа.

Испытуемый раствор. К 400 мл воды очищенной прибавляют 10 мл ацетатного буферного раствора, pH 6,0 и 100 мл воды дистиллированной, перемешивают.

Эталонный раствор. К 2 мл стандартного раствора алюминий-иона (2 мкг/мл) прибавляют 10 мл ацетатного буферного раствора, pH 6,0 и 98 мл воды дистиллированной, перемешивают.

Контрольный раствор. К 10 мл ацетатного буферного раствора, pH 6,0 прибавляют 100 мл воды дистиллированной и перемешивают.

Тяжелые металлы. Не более 0,00001 %.

Определение проводят одним из приведенных методов.

Метод 1. В пробирку диаметром около 1,5 см помещают 10 мл испытуемой воды очищенной, прибавляют 1 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, 2 капли 2 % раствора натрия сульфида и перемешивают. Через 1 мин производят наблюдение за изменением окраски раствора по оси пробирки, помещенной на белую поверхность. Не должно быть окрашивания.

Метод 2. 100 мл воды очищенной упаривают до объёма 20 мл. Оставшаяся после упаривания вода в объеме 10 мл должна выдерживать испытание на тяжёлые металлы (ОФС «Тяжелые металлы») с использованием эталонного раствора, содержащего 1 мл стандартного раствора свинец-иона (5 мкг/мл) и 9 мл испытуемой воды очищенной.

Примечание. Стандартный раствор свинец-иона (5мкг/мл) готовят разбавлением стандартного раствора свинец-иона (100мкг/мл) испытуемой водой очищенной.

Микробиологическая чистота

Федеральный электронный медицинский библиотека

Общее число аэробных микроорганизмов (бактерий и грибов) не более 100 КОЕ в 1 мл. Не допускается наличие *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa* в 100 мл.

Для анализа микробиологической чистоты воды очищенной отбирают образец в объеме не менее 1000 мл.

Исследование проводят методом мембранной фильтрации в асептических условиях в соответствии с методами ОФС «Микробиологическая чистота», п.12.

Бактериальные эндотоксины. Менее 0,25 ЕЭ/мл (ОФС «Бактериальные эндотоксины»).

Испытание проводят для воды очищенной, предназначенной для использования в производстве растворов для диализа.

Хранение и распределение. Вода очищенная хранится и распределяется в условиях, предотвращающих рост микроорганизмов и исключающих возможность любой другой контаминации.

Хранение воды очищенной осуществляют в специальных сборниках, оно не должно превышать 3 сут.

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

Алтея корни	**ФС.2.5.0001.15**
Althaeae radices	**Взамен ГФ X ст. 571**
	Взамен ГФ XI ст. 64

Собранные осенью или весной, тщательно очищенные от земли, высушенные боковые и неодревесневшие, очищенные от пробки стержневые корни дикорастущих и культивируемых многолетних травянистых растений алтея лекарственного – *Althaea officinalis* L. и алтея армянского – *Althaea armeniaca* Ten., сем. мальвовых – *Malvaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Корни, почти цилиндрической формы или расщепленные вдоль на 2 – 4 части, слегка суживающиеся к концу, длиной 10 – 35 см и толщиной до 2 см, очищенные от пробки. Поверхность корней продольно-бороздчатая с отслаивающимися длинными, мягкими лубяными волокнами и темными точками – следами отпавших или отрезанных тонких корней. Излом в центре зернисто-шероховатый, снаружи волокнистый. Цвет корня снаружи и в изломе белый, желтовато-белый (алтей лекарственный) или сероватый (алтей армянский). Запах слабый, своеобразный. Вкус водного извлечения сладковатый с ощущением слизистости.

Измельченное сырье. При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки корней различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет белый, желтовато-белый или серовато-белый. Запах слабый, своеобразный. Вкус

водного извлечения сладковатый с ощущением слизистости.

Порошок. При рассмотрении порошка под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видна смесь частиц белого, желтовато-белого или сероватого цвета, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,2 мм. Запах слабый, своеобразный. Вкус водного извлечения сладковатый с ощущением слизистости.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* Корень имеет вторичное строение. В очищенном сырье в большинстве случаев пробка отсутствует. Покровная часть состоит из клеток паренхимы с тонкими стенками. Клетки паренхимы заполнены крахмальными зернами, местами встречаются мелкие друзы оксалата кальция. Линия камбия узкая, четко выраженная. Сосуды спиральные с простыми и окаймленными порами. Древесина состоит из тонкостенных клеток паренхимы, крупных сосудов, лежащих одиночно или небольшими группами и мелких групп лубяных волокон со слабо утолщенными неодревесневшими стенками, расположенными прерывистыми концентрическими поясами, с заостренными, реже вилообразно разветвленными концами. Сердцевинные лучи одно-, реже двухрядные. В паренхиме должны быть видны многочисленные крупные клетки со слизью, находящиеся как в коре, так и в древесине. Крахмальные зерна простые округлые или овальные, редко встречаются 2–5-сложные.

Измельченное сырье. При рассмотрении давленого микропрепарата под микроскопом должны быть видны фрагменты паренхимы с друзами оксалата кальция, фрагменты паренхимы с крахмальными зернами, фрагменты паренхимы с клетками со слизью, группы лубяных волокон со слабо утолщенными неодревесневшими стенками с заостренными, реже вилообразно разветвленными концами, фрагменты сетчатых и лестничных сосудов. Крахмальные зерна простые округлые или овальные, редко встречаются 2–5-сложные. В микропрепарате могут быть видны фрагменты пробки.

Порошок. Под микроскопом должны быть видны фрагменты

паренхимы с друзами оксалата кальция, фрагменты паренхимы с крахмальными зернами округлой или овальной формы, фрагменты волокон со слабо утолщенными неодревесневшими стенками, часто встречаются их вилообразно разветвленные окончания, фрагменты сетчатых и лестничных сосудов. Встречаются отдельные друзы и крахмальные зерна. Могут встречаться фрагменты пробки.

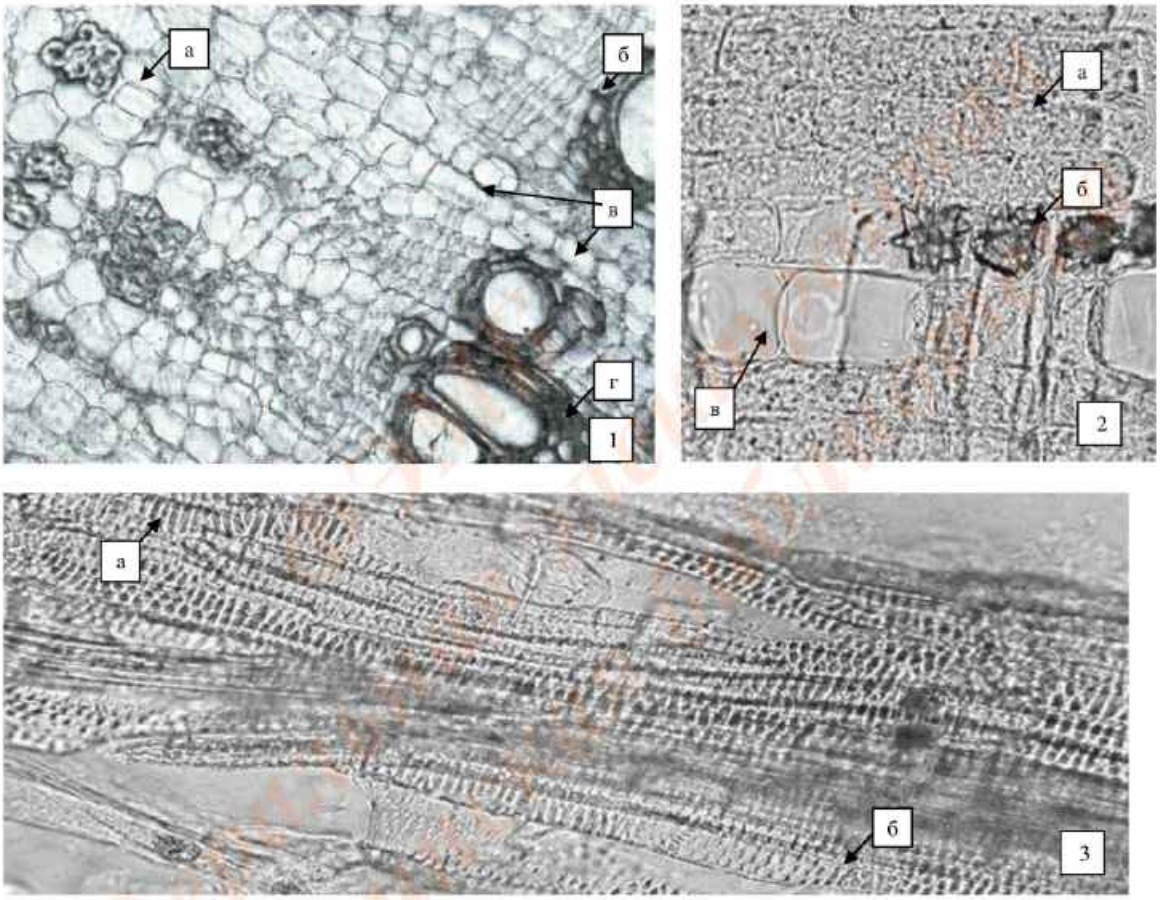


Рисунок – Алтея корни.
1 – поперечный срез корня: а – группа лубяных волокон, б – кабмий, в – сердцевинный луч, г – сосуды (200×), 2 – клетки паренхимы с частично клейстеризованными крахмальными зернами (а) и друзами оксалата кальция (б), крупные слизевые клетки (в) (200×), 3 – лестничные (а) и сетчатые (б) сосуды (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

1. При смачивании излома корня или порошка корня аммиака раствором 10 % или натрия гидроксида раствором 10 % появляется желтое

окрашивание (слизь).

2. При нанесении на излом корня или порошок корня 2 – 3 капель раствора йода должно наблюдаться синее окрашивание (крахмал).

ИСПЫТАНИЯ

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

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 8 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 0,5 %.

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 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 %.

Посторонние примеси

Деревянистые корни. *Цельное сырье* – не более 3 %.

Корни, плохо очищенные от пробки. *Цельное сырье* – не более 3 %.

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

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».

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

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:* экстрактивных веществ, извлекаемых водой, – не менее 15 %.

Определение экстрактивных веществ, извлекаемых водой, проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод холодного настаивания по ОФС «Настои и отвары»).

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».

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Аронии черноплодной свежие плоды	**ФС.2.5.0002.15**
Aroniae melanocarpae recens fructus	**Взамен ФС 42-66-87**

Собранные свежие и зрелые плоды многолетнего культивируемого кустарника или небольшого дерева аронии черноплодной – *Aronia melanocarpa* (*Michx.*) *Elliott*., сем. розоцветных – *Rosaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Плоды шаровидные или чуть вытянутые, яблокообразные до 1,5 см в диаметре, голые, черные, блестящие, иногда с сизым налетом, реже темно-красные, сочные. Плодолистики внутри плода образуют 5 гнезд, в которых расположены семена. Мякоть плода образована сильно разросшимся гипантием, на верхушке плода имеются малозаметные чашелистики. Внутри плода под чашелистиками заметно скопление большого числа волосков, похожее на паутину. Оно остается от завязи, имеющей на верхушке железисто-волосистое опушение. Семена в очертании удлиненно обратнояйцевидные, красновато-коричневые, неясно продольно морщинистые, до 3 мм длиной. Один плод содержит 4 – 8 семян, часть их недоразвита. Запах слабый. Вкус плодов кисловато-сладкий, вяжущий.

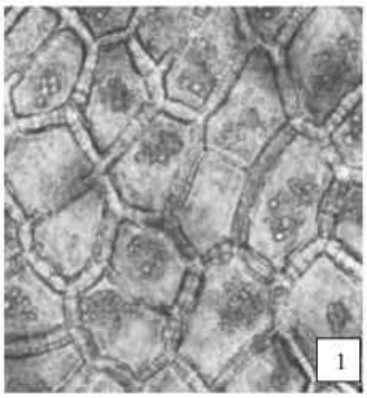
Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении с поверхности эпидермиса должны быть видны толстостенные полигональные клетки, в боковых стенках которых могут быть видны поры. В основном, на эпидермисе верхушки плода встречаются устьица (аномоцитного типа) и простые, одноклеточные, длинные, извивающиеся волоски, в месте прикрепления волоска стенки клеток эпидермиса неравномерно утолщены,

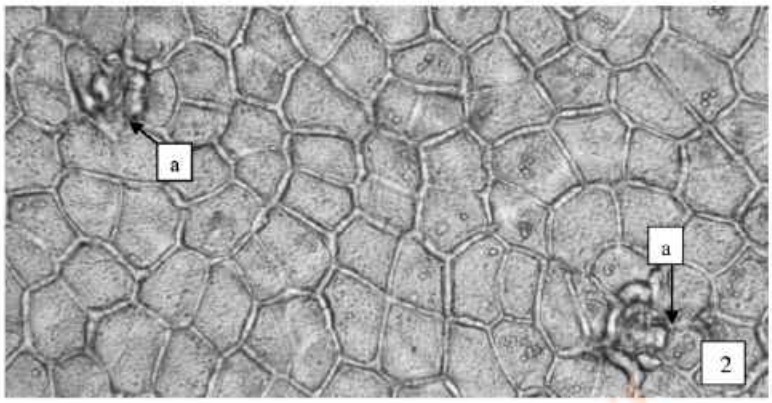
образуют розетку. Различимы следы от отвалившихся волосков благодаря неравномерной утолщенности стенок у клеток, прилегающих к месту крепления волосков.

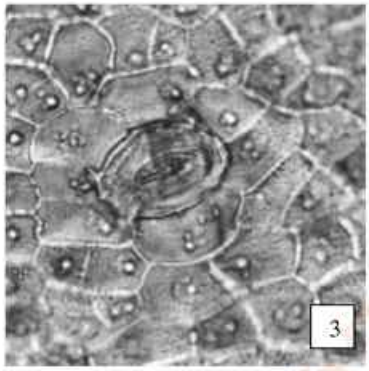
Экзокарпий плодов состоит из нескольких рядов колленхимы, расположенной непосредственно под эпидермисом. Клетки паренхимы, следующего глубже мезокарпия, постепенно укрупняются вовнутрь. В паренхиме мезокарпия имеются многочисленные склереиды неправильной, чаще округлой формы, со сглаженными углами, объединенные в группы из 2 – 3 и более клеток, пронизанные многочисленными поровыми каналами. Каменистые клетки имеют неодинаковую утолщенность стенок. В мякоти плодов в значительном количестве присутствуют друзы оксалата кальция и призматические кристаллы, которые располагаются группами в виде тяжей. Кристаллы имеют правильную призматическую форму, реже ромбическую. Друзы располагаются группами и одиночно.

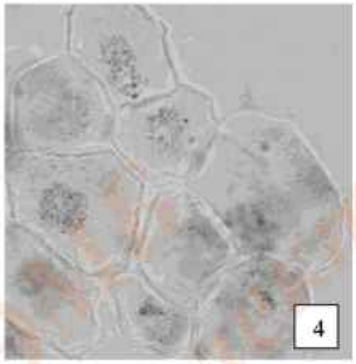
Семена состоят из зародыша, эндосперма, перисперма и семенной кожуры. Эпидермис семенной кожуры состоит из тонкостенных, ослизняющихся, полигональных клеток. Под тонкостенным эпидермисом находятся широкопросветные клетки склеренхимы коричневого цвета, далее располагаются 2 – 3 ряда спавшейся паренхимы, 1 ряд клеток с порами в боковых стенках, далее следует остаток перисперма. В эндосперме и зародыше содержится жирное масло. Клетки эндосперма заполнены мелкими алейроновыми зернами. Слой эндосперма незначителен и представлен 5 – 7 рядами клеток. Паренхима семядолей образована рядами высоких, палисадных пористых клеток.

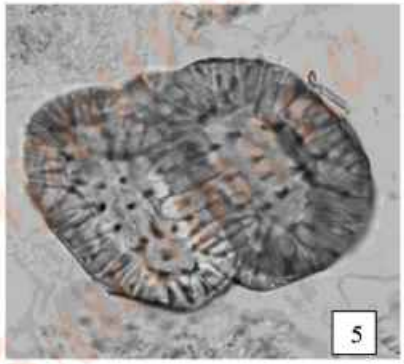
Фармацевтическая электронная медицинская библиотека











Федеральная электронная медицинская библиотека

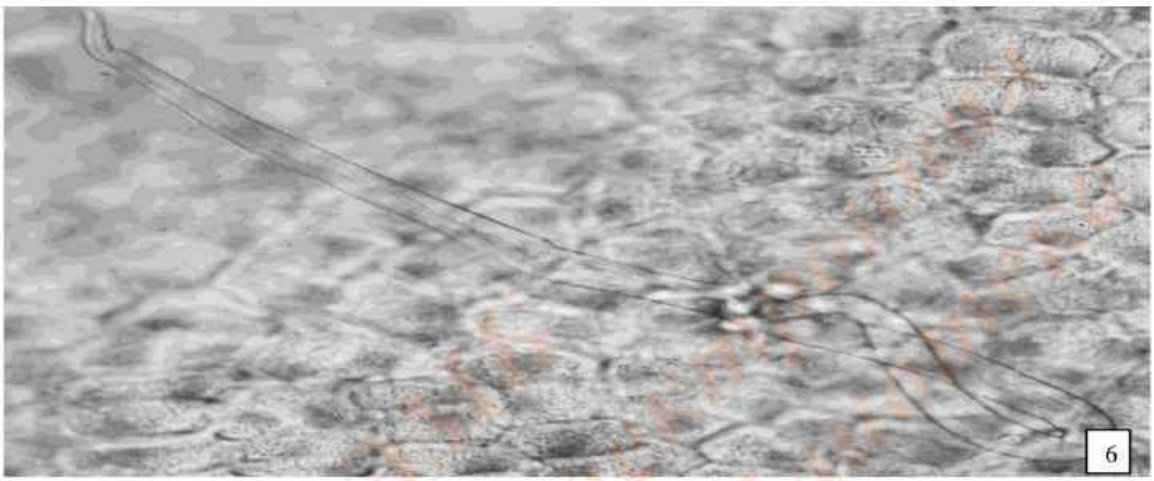


Рисунок – Аронии черноплодной свежие плоды.
1 – фрагмент эпидермиса с порами в боковых стенках (400×); 2 – фрагмент эпидермиса с местами прикрепления волосков (а) (200×); 3 – фрагмент эпидермиса с устьицем аномоцитного типа (200×); 4 – фрагмент мякоти (200×); 5 – каменистые клетки (200×); 6 – фрагмент эпидермиса с простым волоском (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором на алюминиевой

подложке размером 10 × 15 см наносят 5 мкл испытуемого раствора (см. раздел «Количественное определение» приготовление раствора А). Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 1 ч смесью растворителей *н*-бутанол – уксусная кислота ледяная – вода (4:1:2), 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 просматривают при дневном свете.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции фиолетового цвета; допускается обнаружение других зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье* – не менее 70 % и не более 83 % (в соответствии с требованиями ОФС «Определение влажности в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»).

Зола общая. *Цельное сырье* – не более 2 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье* – не более 0,5 %.

Посторонние примеси

Недозрелые плоды. *Цельное сырье* – не более 2 %.

Ветки и другие части растения (в том числе отделенные при анализе). *Цельное сырье* – не более 0,5 %.

Плоды, поврежденные вредителями. *Цельное сырье* – не более 0,5 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье* – не более 2 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье* – 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:* сумма антоцианов в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид – не менее 4 %.

Спирт 96 %, содержащий хлористоводородную кислоту. К 100 мл спирта 96 % осторожно приливают по каплям 1 мл хлористоводородной кислоты концентрированной. Раствор используют свежеприготовленным.

Около 1,0 г (точная навеска) измельченных плодов помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл с притертой пробкой и прибавляют 30 мл спирта 96 %, содержащего хлористоводородную кислоту. Экстракцию проводят при комнатной температуре в течение 120 мин при постоянном перемешивании. Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр с красной полосой в колбу темного стекла (раствор А).

1,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (раствор Б).

Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре при длине волны 534 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют спирт 96 %, содержащий хлористоводородную кислоту.

Содержание суммы антоцианов в пересчете на цианидина-3-О-глюкозид в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 30 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б;

$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения цианидин-3-О-глюкозида при длине волны 534 нм, равный 100;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов». Свежие плоды загружают в деревянные бочки массой нетто 150 кг.

Хранение. На приемных пунктах плоды хранят в прохладном месте не более 3 сут со дня сбора, а при температуре не выше 5 °С – до 2 мес, разложив их тонким слоем.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Аронии черноплодной сухие плоды	**ФС.2.5.0003.15**
Aroniae melanocarpae sicco fructus	**Вводится впервые**

Зрелые, высушенные плоды многолетнего культивируемого кустарника или небольшого дерева аронии черноплодной – *Aronia melanocarpa* (*Michx.*) *Elliott*., сем. розоцветных – *Rosaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Плоды диаметром 3 – 6 мм, бесформенные, сильно сморщенные, в размоченном виде шаровидные. Плодолистики внутри плода образуют 5 гнезд, в которых расположены семена. Мякоть плода образована сильно разросшимся гипантием, на верхушке плода имеются малозаметные чашелистики. Внутри плода под чашелистиками заметно скопление большого числа волосков, похожее на паутину. Оно остается от завязи, имеющей на верхушке железисто-волосистое опушение. Семена в очертании удлиненно обратнояйцевидные, красновато-коричневые, неясно продольно морщинистые, до 3 мм длиной. Плоды черно-синего цвета с сизоватым сиянием. Запах слабый. Вкус водного извлечения кисловато-сладкий, вяжущий.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* Клетки эпидермиса имеют полигональные очертания, местами в боковых стенках должны быть видны поры. На поверхности эпидермиса имеются простые, одноклеточные, длинные, извивающиеся волоски. Различимы следы от отвалившихся волосков благодаря неравномерной утолщенности стенок клеток, прилегающих к месту крепления волосков.

Экзокарпий плодов состоит из нескольких рядов колленхимы,

Федеральный электронный медицинский библиотека

расположенной непосредственно под эпидермисом. Клетки паренхимы, следующего глубже мезокарпия, постепенно укрупняются вовнутрь. В паренхиме мезокарпия имеются многочисленные склереиды неправильной, чаще округлой формы, со сглаженными углами, объединенные в группы из 2 3 и более клеток, пронизанные многочисленными поровыми каналами. Каменистые клетки имеют неодинаковую утолщенность стенок. В мякоти плодов в значительном количестве присутствуют друзы оксалата кальция и призматические кристаллы, которые располагаются группами в виде тяжей. Кристаллы имеют правильную призматическую форму, реже ромбическую. Друзы располагаются группами и одиночно.

Семена состоят из зародыша, эндосперма, перисперма и семенной кожуры. Эпидермис семенной кожуры состоит из тонкостенных, ослизняющихся, полигональных клеток. Под тонкостенным эпидермисом находятся широкопросветные клетки склеренхимы коричневого цвета, далее располагаются 2 – 3 ряда спавшейся паренхимы, 1 ряд клеток с порами в боковых стенках, далее следует остаток перисперма. В эндосперме и зародыше содержится жирное масло. Клетки эндосперма заполнены мелкими алейроновыми зернами. Слой эндосперма незначителен и представлен 5 – 7 рядами клеток. Паренхима семядолей образована рядами высоких, палисадных пористых клеток.

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором на алюминиевой подложке размером 10 × 15 см наносят 5 мкл испытуемого раствора (см. раздел «Количественное определение» приготовление раствора А). Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 1 ч смесью растворителей *н*-бутанол

– ледяная уксусная кислота – вода (4:1:2), 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 просматривают при дневном свете.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции фиолетового цвета, допускается обнаружение других зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. Цельное сырье - не более 17 %.

Зола общая. *Цельное сырье* - не более 3 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье* – не более 0,5 %

Посторонние примеси

Недозрелые плоды. *Цельное сырье* - не более 1 %.

Ветки и другие части растения (в том числе отделенные при анализе). *Цельное сырье* не более 0,5 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье* - не более 2 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье* - 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».

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Количественное определение. *Цельное сырье*: сумма антоцианов в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид не менее 3 %.

Спирт 96 %, содержащий хлористоводородную кислоту. К 100 мл спирта 96 % осторожно приливают по каплям 1 мл хлористоводородной кислоты концентрированной. Раствор используют свежеприготовленным.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл с притертой пробкой и прибавляют 30 мл спирта 96 %, содержащего хлористоводородную кислоту. Экстракцию проводят при нагревании на водяной бане в течение 30 мин. Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр с красной полосой во флакон темного стекла (раствор А).

1,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (раствор Б).

Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре при длине волны 534 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют спирт 96 %, содержащий хлористоводородную кислоту.

Содержание суммы антоцианов в пересчете на цианидина-3-О-глюкозид в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 30 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б;

$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения цианидин-3-О-глюкозида при длине волны 534 нм, равный 100;

a – навеска сырья, г;

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».

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Бадана толстолистного корневища	**ФС.2.5.0004.15**
Bergeniae crassifoliae rhizomata	**Взамен ГФ XI ст. 70**
	(изм. №1 от 01.04.1998)

Собранные летом, освобожденные от земли, корней и надземных частей, разрезанные на куски и высушенные корневища дикорастущего и культивируемого многолетнего травянистого растения бадана толстолистного – *Bergenia crassifolia* (L.) *Fritsch*, сем. камнеломковых – *Saxifragaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Куски корневищ цилиндрической формы длиной до 20 см, толщиной 1 – 3,5 см, имеющие на поверхности чешуевидные остатки черешков листьев и округлые следы корней. Цвет корневища и чешуй, покрывающих корневище, темно-коричне-вый или почти черный. На изломе корневище зернистое, светло-розовое или светло-коричневое. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения сильно вяжущий.

Измельченное сырье. Кусочки корневищ и чешуевидных остатков черешков листьев различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 5 мм. Цвет корневищ в изломе светло-розовый или светло-коричневый, цвет чешуй и пробки темно-коричневый или почти черный. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения сильно вяжущий.

Порошок. Кусочки корневищ и чешуевидных остатков черешков листьев различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Цвет от светло-розового до светло-коричневого с темно-коричневыми, почти черными, реже беловатыми и зеленоватыми вкраплениями. Запах

Федеральный ФЭМБ электронный медицинский библиотека

отсутствует. Вкус водного извлечения сильно вяжущий.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении поперечного среза должно быть видно, что корневище имеет пучковый тип строения. Покровная ткань состоит из 4 – 5 рядов клеток пробки. Проводящие пучки – открытые коллатеральные, расположены прерывистым кольцом. Паренхима коры, сердцевинных лучей и сердцевины состоит из крупных тонкостенных округлых в поперечном сечении клеток, заполненных крахмальными зернами и друзами оксалата кальция. В паренхиме должны быть видны крупные межклетники (аэренхима). Крахмальные зерна простые, округлые.

Измельченное сырье и порошок. При рассмотрении давленного препарата должны быть видны: группы паренхимных клеток, часто окрашенных в коричневый цвет (дубильные вещества), содержащих друзы оксалата кальция и крахмальные зерна, фрагменты лестничных, лестнично-сетчатых и, редко, спиральных сосудов, фрагменты пробки, состоящей из слоев толстостенных клеток. В препаратах соскоба сухого сырья должны быть видны крахмальные зерна, простые, округлые.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

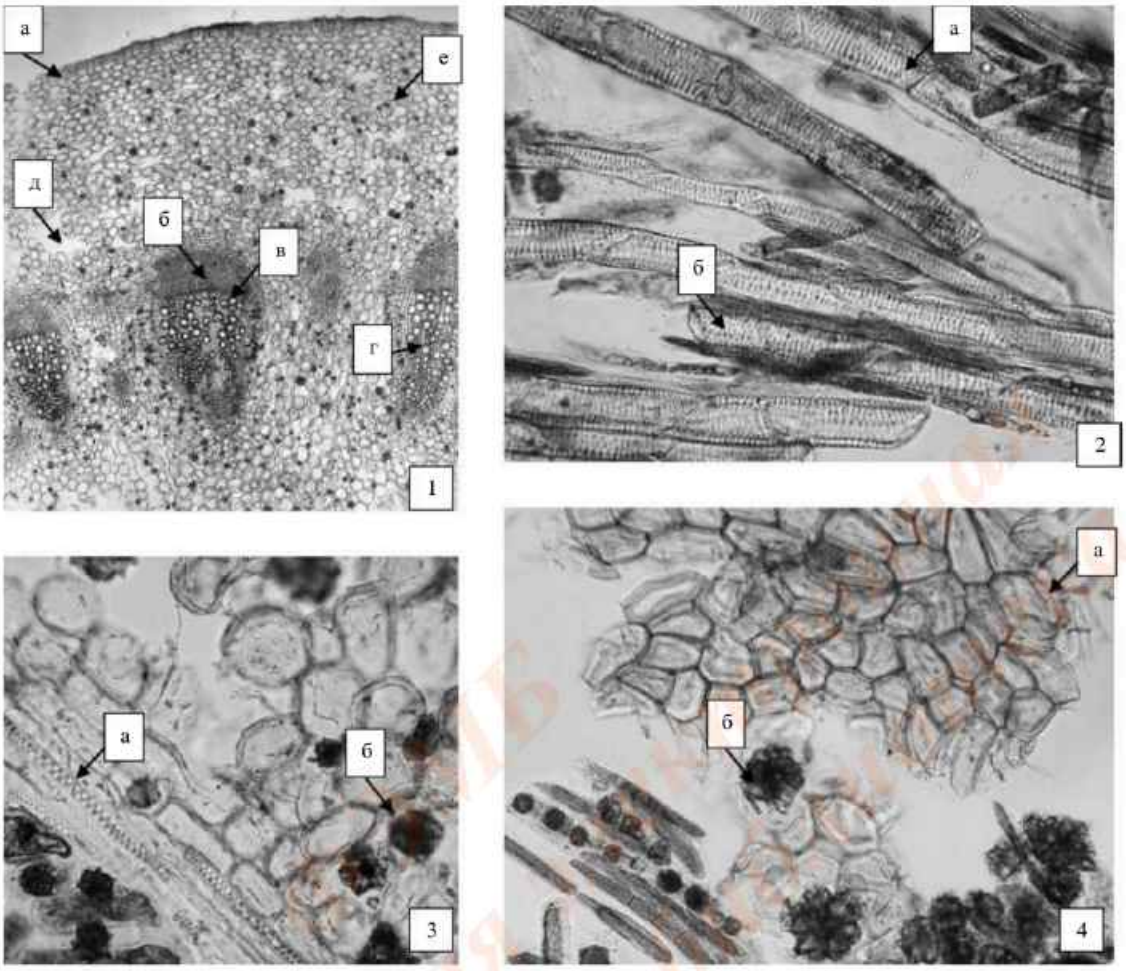


Рисунок – Бадана корневища.
1 – фрагмент поперечного среза корневища: а – пробка, б – элементы флоэмы, в – камбий, г – сосуды древесины, д – крупные межклетники, е – друзы оксалата кальция (40×); 2 – сосуды: а – лестничные , б – лестнично-сетчатые (200×); 3 – фрагменты корневища: а – фрагмент пучка спиральных сосудов, б – клетки паренхимы с друзами оксалата кальция (200×); 4 – фрагменты корневища: а – фрагмент пробки, б – клетки паренхимы с друзами оксалата кальция (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

1. *Тонкослойная хроматография*

Приготовление растворов.

Раствор для детектирования 1. 1,0 г 2,6-дихлорхинонхлоримида растворяют в 100 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор для детектирования 2. Натрия карбоната раствор 2 %. Срок годности раствора не более 30 сут при хранении в прохладном, защищенном

от света месте.

Раствор стандартного образца (СО) арбутина. Около 0,01 г СО арбутина растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около 0,5 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл спирта 50 %, нагревают на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 10 мин. После охлаждения до комнатной температуры полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки размером 10 × 10 см на полимерной подложке со слоем силикагеля наносят 5 мкл испытуемого раствора и 5 мкл раствора СО арбутина. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 40 мин смесью растворителей этилацетат – муравьиная кислота безводная – вода (88:6:6), 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. Хроматограмму обрабатывают раствором для детектирования 1, сушат, затем обрабатывают раствором для детектирования 2, сушат и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО арбутина должна обнаруживаться зона адсорбции синего цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться зона синего цвета на уровне зоны на хроматограмме раствора СО арбутина, зона адсорбции синего или коричнево-синего цвета и зона коричневого цвета выше зоны арбутина; допускается обнаружение других зон.

2. При смачивании излома корневищ, кусочков измельченного сырья или порошка железа(III) аммония сульфата раствором 1 % или железа(III)

хлорида раствором 1 % должно наблюдаться черно-синее окрашивание (дубильные вещества).

ИСПЫТАНИЯ

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

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 4 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 0,5 %.

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

Корни, надземные части, в том числе отделенные при анализе. *Цельное сырье* – не более 1 %.

Сырье, изменившее окраску (потемневшее и почерневшее). *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3 %.

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

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

Тяжелые металлы. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

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:* дубильных веществ – не менее 20 %.

Определение дубильных веществ проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1, из навески 1,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм).

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».

Федеральная электронная медицинская библиотека ЭЭМБ

Березы листья **ФС.2.5.0005.15**

Betulae folia **Взамен ВФС 42-2487-95**

Собранные в период вегетации (июнь – июль) и высушенные листья дикорастущих деревьев березы повислой (березы бородавчатой) – *Betula pendula Roth*. (*Betula verrucosa Ehrh*.) и березы пушистой – *Betula pubescens Ehrh*, сем. березовых – *Betulaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Цельные или частично измельченные листья, простые, черешковые, без прилистников. Листовые пластины ромбические, треугольные или треугольно-яйцевидные по форме, длиной от 3,0 до 6,5 см, шириной от 2,0 до 5,5 см. Верхушка листа заостренная, основание клиновидное, округлое. Край листовой пластинки дважды остропильчатый. Жилкование перистое. Листовая пластинка слабо опушенная по всей поверхности с обеих сторон (*B. pubescens*) или почти голая, с редкими волосками по краю ближе к верхушке и по жилкам с нижней стороны (*B. pendula*), золотисто-желтые блестящие железки по всей поверхности с обеих сторон листовой пластинки и на черешке. Цвет листьев с верхней стороны – зеленый, коричневато-зеленый, с нижней стороны – светло-зеленый, серо-зеленый, светлый коричневато-зеленый. Запах своеобразный, слабо ароматный. Вкус водного извлечения горьковатый.

Измельченное сырье. Кусочки листовых пластинок различной формы и черешков, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 5 мм.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки листовых пластинок с мелкопильчатозубчатым или удвоеннопильчатозубчатым краем, с редкими волосками с обеих сторон (*B. pubescens*) или голые (*B. pendula*), с золотисто-желтыми блестящими железками по всей поверхности с обеих сторон; кусочки черешков, редко – веточек с желтовато-белой древесиной и коричневой корой.

Цвет измельченного сырья от зеленого до коричневато-зеленого со светло-зелеными, серо-зелеными и редкими желтовато-коричневыми, желтовато-белыми или коричневыми вкраплениями.

Запах своеобразный, слабо ароматный. Вкус водного извлечения горьковатый.

Порошок. Кусочки листовых пластинок различной формы и черешков, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки листовых пластинок с мелкопильчатозубчатым или удвоеннопильчатозубчатым краем, с редкими волосками с обеих сторон (*B. pubescens*) или голые (*B. pendula*), с золотисто-желтыми блестящими железками по всей поверхности с обеих сторон; кусочки черешков, редко – веточек с желтовато-белой древесиной и коричневой корой.

Цвет порошка от зеленого до коричневато-зеленого со светло-зелеными, серо-зелеными и редкими желтовато-коричневыми, желтовато-белыми или коричневыми вкраплениями. Запах своеобразный, слабо ароматный. Вкус водного извлечения горьковатый.

Микроскопические признаки. *Цельное, измельченное сырье и порошок.* При рассмотрении листа с поверхности должны быть видны клетки эпидермиса верхней стороны листа, состоящие из клеток правильной 4–6-угольной формы с ровными стенками. Клетки эпидермиса нижней стороны листовой пластинки в очертании более извилистые, по размерам сравнимы с клетками верхнего эпидермиса или несколько мельче. Устьица аномоцитного типа. Околоустьичных клеток 4 – 8, чаще 6. Устьица расположены

преимущественно с нижней стороны листовой пластинки. На поперечном срезе должен быть виден двух-, трехслойный столбчатый мезофилл. В обкладочной паренхиме жилок листовой пластинки локализованы крупные ромбической формы кристаллы и мелкие друзы.

На эпидермисе должны быть видны крупные щитковидные железки, расположенные с обеих сторон листа, чаще по жилкам. Железки с крупными бесцветными головками. Головки состоят из большого количества клеток и расположены лучами от центра. Кутикула над головкой мощная, чешуйчатая, нередко отслаивается, обнажая клетки, формирующие головку трихомы. Клетки ножки железок, как правило, окрашены пигментом темно-коричневого цвета. Кутикула обусловливает глянцевую, слегка шершавую поверхность листа. По жилкам и по краю листовой пластинки встречаются простые одноклеточные волоски с толстыми стенками, расширенным основанием и заостренной верхушкой. Вблизи жилок видны друзы оксалата кальция. Щитковидные железки характерного строения и редкие мелкие волоски видны на эпидермисе черешка листа.

При рассмотрении микропрепаратов порошка должны быть видны фрагменты: эпидермиса верхней стороны листа, состоящего из клеток правильной 4–6-угольной формы; эпидермиса нижней стороны листа с извилистыми стенками клеток; эпидермиса листа с округлыми устьицами аномоцитного типа; жилок с крупными кристаллами ромбической формы и мелкими друзами в обкладочной паренхиме; эпидермиса листа с крупными щитковидными железкам; жилок и края листа с простыми одноклеточными волосками с толстыми стенками, расширенным основанием и заостренной верхушкой; эпидермиса черешка с щитковидными железками и мелкими простыми волосками; а также отдельные отпавшие щитковидные железки и простые волоски.

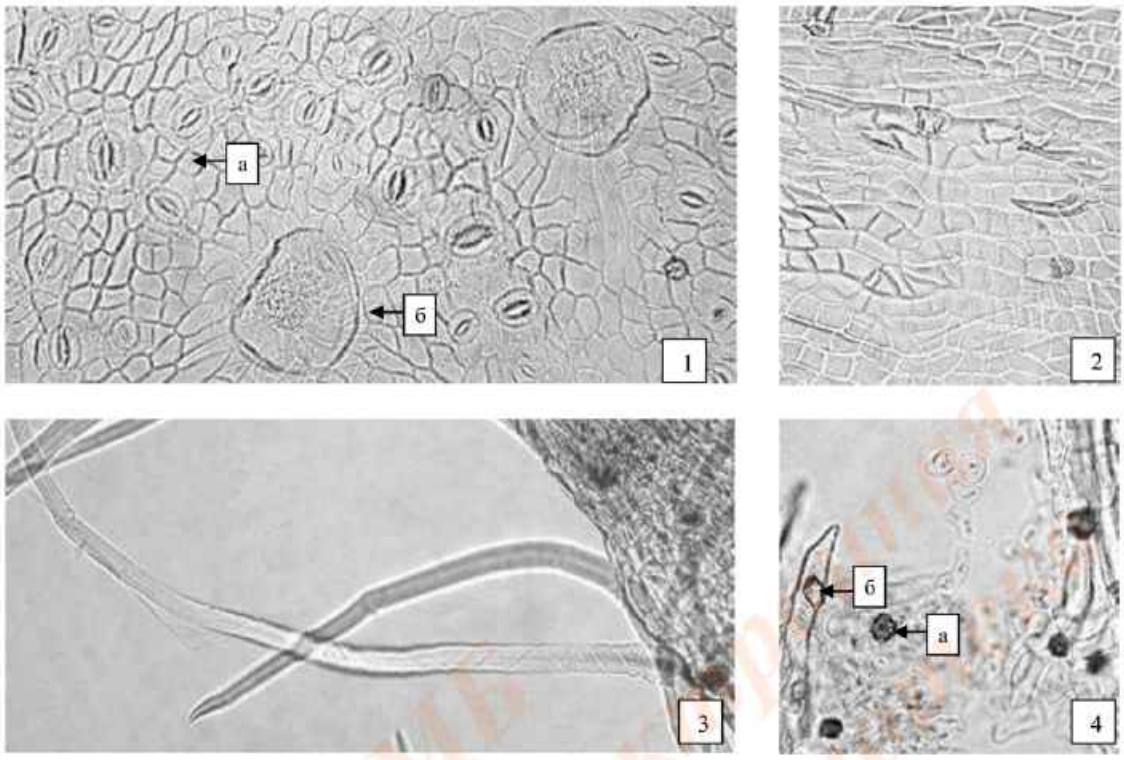


Рисунок – Березы листья.
1 – фрагмент эпидермиса нижней стороны листа: а – устьица аномоцитного типа, б – железка (200×); 2 – фрагмент эпидермиса, черешка с мелким простым волоском (200×); 3 – простые толстостенные волоски (200×); 4 – друзы (а) и призматические кристаллы (б) оксалата кальция (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Около 1,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещают в колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 10 мл спирта 40 % и нагревают с обратным холодильником при умеренном кипении на электроплитке с закрытой спиралью в течение 15 мин. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр с красной полосой (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором на алюминиевой подложке размером 10 × 15 см наносят 6 мкл испытуемого раствора, 10 мкл раствора стандартного образца (СО) гиперозида (см. раздел «Количественное

определение» приготовление раствора А СО гиперозида). Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 1 ч смесью растворителей хлороформ – спирт 96 % – вода (26:16:3), 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 просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться доминирующая зона адсорбции фиолетового цвета на уровне зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО гиперозида; допускается обнаружение других зон адсорбции.

Пластинку обрабатывают свежеприготовленным диазореактивом, помещают в сушильный шкаф и выдерживают при температуре 110 °С в течение 5 мин и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться доминирующая зона адсорбции желтовато-оранжевого цвета на уровне зоны адсорбции СО гиперозида; допускается обнаружение других зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 12 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 7 %.

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 0,18 мм, – не более 5 %. *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

размером 2 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Другие части растения (ветки, части соцветий). *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 2 %.

Сырье, изменившее окраску (пожелтевшее и почерневшее). *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 5 %.

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

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

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:* содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид – не менее 1,5 %.

Приготовление растворов.

Раствор СО гиперозида. Около 0,02 г (точная навеска) СО гиперозида растворяют в мерной колбе вместимостью 50 мл в 35 мл спирта 70 % при периодическом помешивании, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор А СО гиперозида).

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

1,0 мл раствора А СО гиперозида помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл прибавляют 1 мл алюминия хлорида раствора 2 % и 1 каплю уксусной кислоты разбавленной 30 %, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б СО гиперозида).

Срок годности растворов 30 сут.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл с притертой пробкой, прибавляют 100 мл спирта 50 % и взвешивают с точностью ± 0,01 г. Колбу с содержимым присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 2 ч. После охлаждения до комнатной температуры колбу взвешивают, доводят ее содержимое спиртом 50 % до первоначальной массы, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр (раствор А испытуемого раствора).

1,0 мл раствора А испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 1 мл алюминия хлорида раствора 2 % в спирте 96 % и 1 каплю уксусной кислоты разбавленной 30 %, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора).

Оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора измеряют через 30 мин на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор состоящий из 1 мл раствора А испытуемого раствора, 1 капли уксусной кислоты разбавленной 30 %, доведенный спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО гиперозида в тех же условиях. В качестве раствора сравнения используют раствор состоящий из 1 мл раствора А СО гиперозида, 1 капли уксусной кислоты разбавленной 30 %, доведенный спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 25 \cdot P \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot 50 \cdot 25 \cdot a \cdot 1 \cdot 100 \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
A_0 – оптическая плотность раствора Б СО гиперозида;
a_0 – навеска СО гиперозида, г;
a – навеска сырья, г;
P – содержание основного вещества в СО гиперозида, %;
W – влажность сырья, %.

Допускается содержание суммы флавоноидов вычислять с использованием удельного показателя поглощения комплекса гиперозида с алюминия хлоридом по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса гиперозида с алюминия хлоридом при длине волны 410 нм, равный 380.
a – навеска сырья, г;
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».

Федеральная ФЭМБ
медицинская электронная
библиотека

Березы почки	**ФС.2.5.0006.15**
Betulae gemmae	**Взамен ГФ XI ст. 41**

Собранные до распускания в зимне-весенний период (январе – апреле) и высушенные листовые почки дикорастущих деревьев березы повислой (березы бородавчатой) – *Betula pendula Roth.* (*Betula verrucosa Ehrh.*) и березы пушистой – *Betula pubescens Ehrh.*, сем. березовых – *Betulaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Почки удлиненно-конические, заостренные или притупленные, часто клейкие. Почечные чешуи расположены черепицеобразно, плотно прижаты по краям, слегка реснитчатые (нижние короче верхних и иногда с несколько отстающими кончиками); длина почек 3–7 мм, в поперечнике – 1,5–3 мм. Цвет почек коричневый, у основания иногда зеленоватый. Запах бальзамический, приятный. Вкус водного извлечения слегка вяжущий, смолистый.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении поперечных срезов почки должно быть видно полуобъемлющее по типу почкосложение. В центре видны крупные зачатки 2 – 3 листьев. Характер листосложения – складчатый. Между фрагментами крупных складчатых чешуй локализованы поперечные сечения мелких, не складчатых, ровной формы, сложенных пополам фрагментов зачатков листьев. На срезах в базальной части, рядом с основанием почки, складчатые фрагменты зачатков листьев отсутствуют. В центре поперечного среза базальной части почки заметны фрагменты 2 черешков. Поперечные сечения черешков округлые с углублением в верхней части. Проводящие элементы черешка представлены

одним закрытым коллатеральным пучком С-образной формы.

Поверхность зачатков листьев, их черешков и кроющих чешуй опушена щитковидными железками. Головки железок многоклеточные округлые 8-, 9-клеточные. Клетки головки тонкостенные, прозрачные, с каплями эфирного масла. Ножка железки крупная, многоклеточная, состоит из овальных или слегка вытянутых клеток, заполненных коричневым содержимым.

Помимо щитковидных железок на поверхности зачатков листьев имеются простые одноклеточные бичевидные волоски с сильно утолщенной, иногда лигнифицированной клеточной стенкой. Протопласт бичевидных волосков аморфный, коричневого или темно-желтого цвета.

Кроющие чешуи почек опушены слабее. На поперечных срезах кроющих чешуй должны быть видны простые бичевидные волоски, локализованные по краю. Железки конусовидной формы на кроющих чешуях локализованы у их основания. Клетки, составляющие головку конусовидных железок, образуют головку от самого основания трихомы. Ножка железки на продольном срезе – треугольной формы и состоит из мелких, слегка вытянутых клеток, заполненных коричневым содержимым.

Мезофилл зачатков листьев на поперечном срезе однороден и представлен тонкостенными клетками округлой, иногда продолговатой формы, с зернистым протопластом желто–зеленого цвета. Эпидермис зачатков листьев тонкостенный, слабо кутинизированный. Непосредственно под эпидермой в мезофилле локализованы многочисленные друзы и кристаллы оксалата кальция. В мезофилле зачатков листьев, ближе к базальной части почки, имеются многочисленные проводящие пучки коллатерального типа. Проводящие элементы ксилемы на поперечном срезе имеют многоугольную форму, их стенки лигнифицированы.

Эпидермис чешуй с внешней стороны сильно кутинизирован. Полости клеток пигментированы. Под эпидермисом локализован блок пластинчатой колленхимы. На внешней и внутренней поверхностях почечных чешуй, в

эпидермисе, изредка встречаются сформированные чечевички. Этот признак характерен особенно для краевых чешуй. Мезофилл кроющих чешуй состоит из более крупных, чем у зачатков листьев, округлых клеток. Протопласт клеток мезофилла пигментирован. Характер пигментации зависит от локализации чешуй. В мезофилле краевых чешуй пигментация сильнее. Мезофилл внутренних чешуй практически не пигментирован.

Проводящие пучки кроющих чешуй мелкие, с малым количеством проводящих элементов.

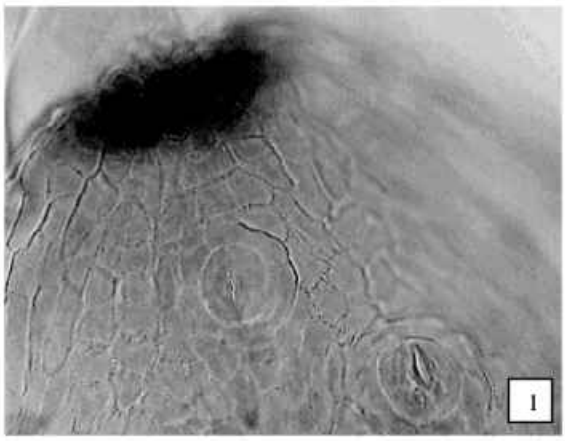
При рассмотрении чешуи почки с поверхности должно быть видно, что клетки эпидермиса наружной стороны чешуи более толстостенные, чем внутренней, стенки клеток эпидермиса наружной стороны чешуи утолщаются по направлению от основания к верхушке и краям чешуи.

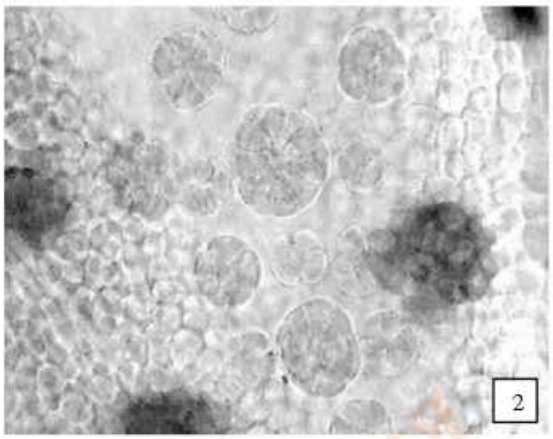
На верхушке и по краю чешуй эпидермис опушен простыми одноклеточными волосками; по краю они более толстостенные и значительной длины. Устьица располагаются с наружной стороны чешуй. Сквозь эпидермис внутренней стороны просвечивают узкие проводящие пучки со спиральными элементами ксилемы и многочисленные мелкие друзы. У внутренних чешуй стенки клеток эпидермиса утолщены только в нижней части чешуи.

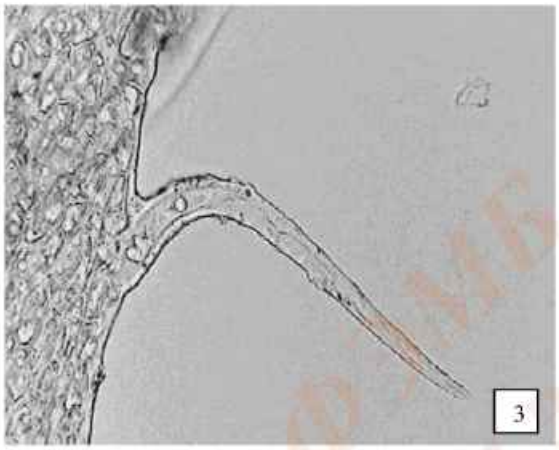
На зубцах края зачатков листьев локализованы крупные конусообразные железки, аналогичные описанным ранее для кроющих чешуй. Поверхность зачатков листьев густо опушена многочисленными крупными железками коричневого цвета в различных стадиях развития.

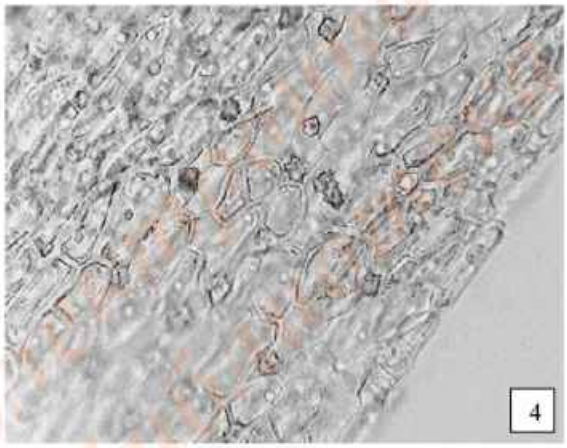
С нижней стороны эпидермиса листового зачатка наблюдаются устьица. По жилкам зачатка листьев и его краям, особенно у основания листочков, расположены простые одноклеточные бичевидные волоски, аналогичные волоскам чешуй. Сквозь эпидермис просвечивают друзы оксалата кальция.

Федеральный электронный медицинский библиотека ФЭМБ









Федеральная медицинская библиотека

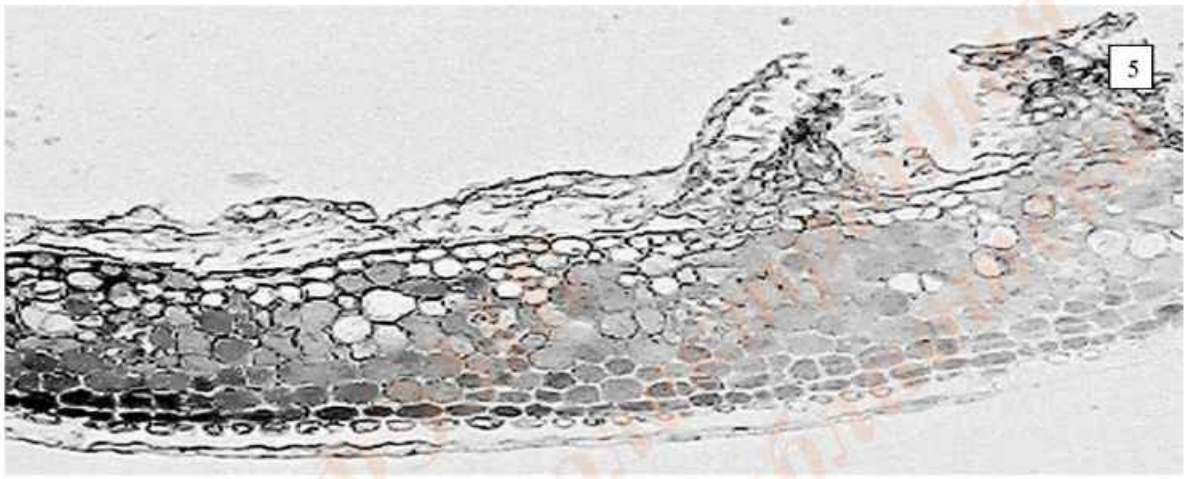


Рисунок – Березы почки.
1 – фрагмент эпидермиса кроющей чешуи с устьицами (400×); 2 – фрагмент эпидермиса с железками (400×); 3 – простой бичевидный волосок; 4 – друзы оксалата кальция; 5 – фрагмент поперечного среза кроющей чешуи с конусовидной железкой (400×).

Определение основных групп биологически активных веществ

1. ***Тонкослойная хроматография***

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) судана красного G. Около 0,0025 г СО судана красного G растворяют в 10 мл спирта 96 %. Срок годности раствора 6 мес при хранении в прохладном, защищенном от света

месте.

Анисового альдегида раствор. Смешивают последовательно: 0,5 мл анисового альдегида, 10 мл уксусной кислоты ледяной, 85 мл спирта 96 % и 5 мл серной кислоты концентрированной. Срок годности раствора 30 суток при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около 0,5 г сырья измельченного до однородной массы помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл спирта 70 % и нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 15 мин. Колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры, после чего ее выдерживают в морозильной камере при температуре минус 18 ºС в течение не менее 1 ч. Содержимое колбы быстро фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки на полимерной подложке размером 10 × 10 см наносят 10 мкл испытуемого раствора и 3 мкл раствора СО судана красного G.

Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 30 мин смесью растворителей толуол – этилацетат – муравьиная кислота безводная (95:5:2), и хроматографируют восходящим способом. После того как фронт растворителей пройдет 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей.

Пластинку обрабатывают анисового альдегида раствором и выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100 – 105 ºС в течение 2 – 3 мин и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО судана красного G должна обнаруживаться зона судана розового, розово-фиолетового или фиолетового цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться 4 зоны адсорбции фиолетового, сине-фиолетового или серо-фиолетового цвета ниже зоны на хроматограмме СО судана красного G, зона адсорбции

розового, розово-фиолетового или фиолетового цвета на уровне зоны судана красного G, одна зона адсорбции фиолетового, сине-фиолетового или серо-фиолетового цвета чуть выше зоны судана красного G; допускается обнаружение других зон адсорбции (липофильные соединения).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье* – не более 10 %.

Зола общая. *Цельное сырье* – не более 4 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье* – не более 0,7 %.

Посторонние примеси

Другие части березы (веточки, в том числе отделенные от почек при анализе, сережки и пр.). *Цельное сырье* – не более 8 %.

Почки, тронувшиеся в рост и распустившиеся. *Цельное сырье* – не более 2 %.

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

Минеральная примесь. *Цельное сырье* – 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:* сумма флавоноидов в пересчете на лютеолин – не менее 2,5 %; эфирного масла – не менее 0,2 %.

Сумма флавоноидов

ЭБС Фармединой электронной библиотеки

Приготовление растворов.

Раствор СО лютеолина. Около 0,02 г (точная навеска) СО лютеолина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 35 мл спирта 96 % и растворяют при нагревании (70–80 °С). Содержимое колбы охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и тщательно перемешивают (раствор А СО лютеолина). Срок годности раствора 30 сут.

1,0 мл раствора А СО лютеолина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 2 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 % и 1 каплю уксусной кислоты разбавленной 30 %, доводят объем спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б СО лютеолина). Срок годности раствора 30 сут.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу с притертой пробкой вместимостью 100 мл и прибавляют 40 мл спирта 70 %. Колбу закрывают пробкой, взвешивают с погрешностью ± 0,01 г, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 1 ч. Содержимое колбы охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и доводят спиртом 70 % до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр с красной полосой, отбрасывая первые 10 мл. 5,0 мл фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствора А испытуемого раствора).

1,0 мл раствора А испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 2 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 % и 1 каплю уксусной кислоты разбавленной 30 %, доводят объем спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора).

Оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора измеряют через 30 мин на спектрофотометре при длине волны 400 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор состоящий из 1 мл раствора А испытуемого раствора и 1 капли уксусной кислоты разбавленной 30 %, доведенный спиртом 96 % до метки в мерной

колбе вместимостью 50 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО лютеолина в тех же условиях. В качестве раствора сравнения используют раствор состоящий из 1 мл раствора А СО лютеолина, 1 капли уксусной кислоты разбавленной 30 %, доведенный спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 50 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X \frac{A \cdot 40 \cdot 25 \cdot 50 \cdot a_0 \cdot 1 \cdot P \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 5 \cdot 1 \cdot 50 \cdot 50 \cdot 100 \cdot (100 - W)} \cdot 100,$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;

A_o –оптическая плотность раствора Б СО лютеолина;

a – навеска сырья, г;

a_o – навеска СО лютеолина, г;

P – содержание основного вещества в СО лютеолина, %;

W – влажность сырья, %.

Допускается содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин вычислять с использованием удельного показателя поглощения комплекса лютеолина с алюминия хлоридом по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 40 \cdot 25 \cdot 50 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 5 \cdot 1 \cdot (100 - W)} \cdot 100,$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;

$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса лютеолина с алюминия хлоридом при длине волны 400 нм, равный 410;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Эфирное масло

В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания

эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1; навеска 10,0 или 20,0 г измельченного сырья до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, время перегонки 2 ч).

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».

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Бессмертника песчаного цветки	**ФС.2.5.0007.15**
Helichrysi arenarii flores	**ГФ X ст. 273**
	Взамен ГФ XI ст. 9
	(изм. № 2 от 22.09.1999)

Собранные до распускания цветков и высушенные корзинки дикорастущего многолетнего травянистого растения бессмертника (цмина) песчаного – *Helichrysum arenarium* (L.) *Moench*, сем. астровых – *Asteraceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Щитковидные соцветия, состоящие из 20 – 35 мелких корзинок, или части этих соцветий, иногда отдельные корзинки и цветки. Корзинки по форме шарообразные или слабо-вытянутые, одиночные или по несколько вместе, диаметром 4 - 7 мм каждая, с остатками беловойлочных цветоносов (осевых частей соцветия) длиной не более 1 см. Цветки расположены на голом цветоложе и окружены многочисленными неплотно прижатыми листочками обвертки. Все цветки в корзинке трубчатые обоеполые, с хохолком; отгибы венчика пятизубчатые. Обвертка корзинки 3-4-рядная состоит из черепитчато-расположенных, лепестковидных, неплотно прижатых, выпуклых листочков лимонно-желтого цвета. Листочки обвертки сухие, пленчатые, блестящие, неоднородные по форме: наружные – широко ланцетовидные; внутренние – линейные. Все листочки обвертки с пленчатым краем и коричневатой или зеленовато-серой полоской посередине. Цветоложе корзинок плоское или слегка выпуклое, мелко-ямчатое. Цветки корзинки, как правило, морфологически различимы и разделяются на срединные и краевые.

Краевые цветки немногочисленные (обычно 5 - 7) пестичные или обоеполые, с длинной узкой трубкой околоцветника; венчики по форме нитевидные, пятизубчатые, лимонно-желтого цвета.

Срединные цветки многочисленные, мелкие, в 1,5 - 2 раза мельче краевых; обоеполые, трубки их венчиков 5-зубчатые и с 3 - 4 дополнительными менее выраженными зубцами, обычно желтые или оранжевые.

Цвет листочков обвертки лимонно-желтый, иногда с красновато-оранжевыми верхушками, венчиков цветков – лимонно-желтый или оранжевый; цветоносов и листьев – серый, зеленовато- или коричневато-серый. Запах слабый, ароматный. Вкус водного извлечения пряно-горький.

Измельченное сырье. Корзинки одиночные, редко по 2 - 3 вместе, шаровидные, отдельные цветоложа и их кусочки с остатками или цельными листочками обвертки, отдельные листочки обвертки, трубчатые цветки и их части, кусочки цветоносов, листьев и стеблей, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.

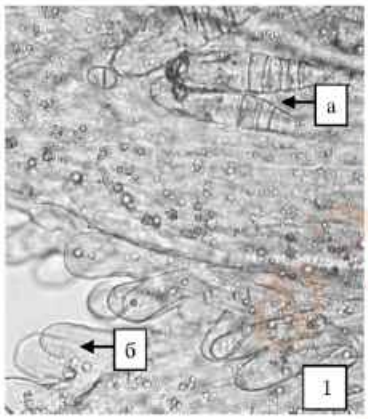
При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны цельные корзинки, отдельные мелкоямчатые цветоложа или их кусочки зеленовато-коричневого цвета; цветоложа с остатками или цельными листочками обвертки; отдельные пленчатые листочки обвертки лимонно-желтого цвета с коричневатой или зеленовато-серой полосой по центру в нижней части; трубчатые цветки с пятизубчатым венчиком желтого или оранжевого цвета, как правило, без хохолка и завязи; белесые кусочки многоклеточных волосков хохолка, отдельные завязи коричневого цвета; кусочки опушенных цветоносов, листьев и стеблей беловато- или зеленовато-серого, редко серовато-коричневого цвета; кусочки цветоносов, листьев и стеблей почти голые (волоски удалены при измельчении) от темно-коричневого до зеленовато-коричневого цвета; редко встречаются продольно-расщепленные кусочки стеблей с белесой сердцевиной.

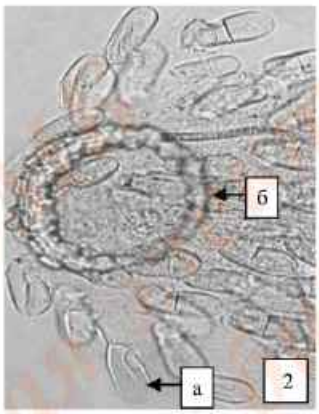
Репозиторий ГомГМУ
Медицинская электронная библиотека

Цвет серовато-желтый с лимонно-желтыми, оранжевыми, беловато- или зеленовато-серыми, редко серовато-коричневыми, темно-коричневыми и зеленовато-коричневыми вкраплениями. Запах слабый, ароматный. Вкус водного извлечения пряно-горький.

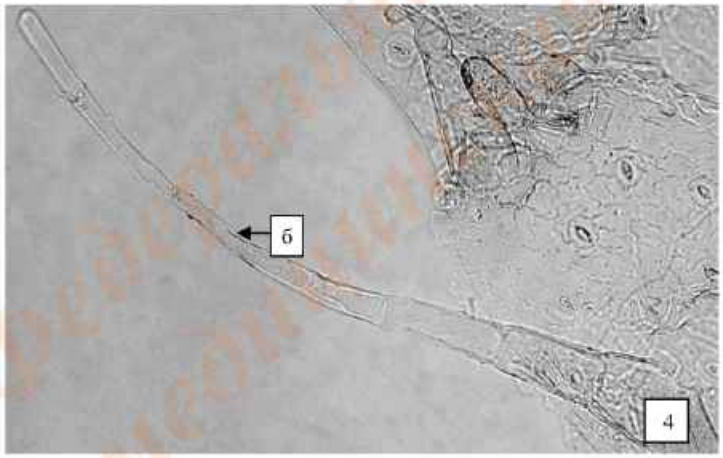
Микроскопические признаки. *Цельное сырье, измельченное сырье*. При рассмотрении микропрепаратов с поверхности должны быть видны: листочки обвертки, мезофилл которых состоит из клеток с утолщенными пористыми стенками, в суженной части листочка – многочисленные простые бичевидные волоски, состоящие из нескольких коротких клеток основания и одной длинной конечной клетки; эфирномасличные железки, овальные, двухрядные, многоярусные, состоящие из 8 – 12 клеток; слегка вытянутые клетки эпидермиса с устьицами аномоцитного типа; по центру листочка, в мезофилле, видны многочисленные короткие трахеиды проводящего пучка; отдельные цветки, у которых видна овальная завязь, сплошь покрытая крючкообразно-загнутыми волосками, в основании завязи – кольцо из четырехугольных клеток с утолщенными одревесневшими оболочками, на верхушке завязи кольцом расположен хохолок, состоящий из длинных многоклеточных волосков, сросшихся у основания, хохолок часто отломан и встречаются только отдельные волоски или их фрагменты; венчик пятизубчатый трубчатый, клетки эпидермиса внутренней стороны зубцов с сосочковидными выростами и складчатой кутикулой, наружной стороны – с многочисленными железками характерного строения; пыльники пленчатые в количестве 5, пестик с двухлопастным рыльцем; пыльца округлая и округло-трехгранная шиповатая трехпоровая с шиповатой экзиной; фрагменты цветоложа незрелого соцветия с многочисленными зачатками трубчатых цветков с железками и волосками хохолка; фрагменты цветоложа зрелого соцветия с многочисленными ответвлениями проводящих пучков, окруженные кольцом округло-многоугольных клеток с утолщенными одревесневшими оболочками (места прикрепления завязей трубчатых цветков); фрагменты листа, клетки эпидермиса которого с нижней стороны с

извилистыми, с верхней – с почти прямыми стенками, устьица аномоцитного типа с обеих сторон листа, многочисленные волоски, состоящие из крупного многоклеточного основания и длинной конечной шнуровидной клетки с расширенным основанием, железки характерного строения, более многочисленные с нижней стороны листа; фрагменты цветоносов и стеблей, эпидермис которых состоит из продольно-вытянутых клеток и сплошь покрыт волосками характерного строения, встречаются железки и устьица; в сердцевине стебля, среди удлиненно-прямоугольных клеток паренхимы, расположены сосудистые пучки, представленные сетчато-лестничными, лестничными и спиральными сосудами.









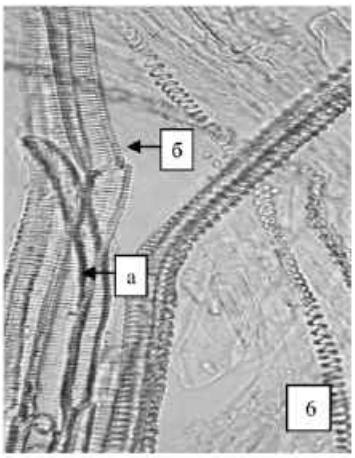




Рисунок – Бессмертника песчаного цветки.
1 – фрагмент эпидермиса лепестка венчика: а – эфирномасличные железки, б – сосочковидные выросты (200×); 2 – фрагмент завязи: а – крючкообразно-загнутые волоски, б – кольцо механических клеток (200×); 3 – волоски хохолка (200×); 4 – фрагмент эпидермиса листа: а – устьица аномоцитного типа, б – простой многоклеточный волосок (100×); 5 – фрагмент эпидермиса листа с бичевидными волосками (100×); 6 – лестничные (а) и спиральные (б) сосуды (200×).

Определение основных биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Раствор стандартного образца (СО) лютеолин-7-гликозида. Около 0,1 г СО лютеолин-7-гликозида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 85 мл спирта 70 % и нагревают на водяной бане до полного растворения. Затем охлаждают, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор А СО лютеолин-7-гликозида). Срок годности раствора 3 мес.

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором на алюминиевой подложке размером 10 × 15 см наносят 20 мкл испытуемого раствора (см. раздел «Количественное определение» приготовление раствора А испытуемого раствора) и 10 мкл раствора СО лютеолин-7-гликозида. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 2 ч смесью растворителей хлороформ – спирт 96 % – вода (26:16:3), 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 просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО лютеолин-7-гликозида должна обнаруживаться доминирующая зона адсорбции светло-желтого цвета.

При просмотре хроматограммы в УФ-свете при длине волны 254 нм на уровне зоны СО лютеолин-7-гликозида обнаруживается доминирующая флуоресцирующая зона адсорбции желтовато-фиолетового цвета. Затем хроматограмму проявляют диазореактивом и нагревают при 100 – 105 °С. При этом зона адсорбции лютеолин-7-гликозида приобретает оранжевую окраску; допускается наличие других зон.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 12 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 8 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 4 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* измельченных частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье*: частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Кусочки стеблей и цветоносов. *Цельное сырье, измельченное сырье* - не более 10 %.

Соцветия с остатками стеблей длиной свыше 1 см. *Цельное сырье* – не более 5 %.

Остатки корзинок (цветоложе с обвертками). *Цельное сырье* – не более 5 %.

Сырье, изменившее окраску (потемневшее и почерневшее). *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3 %.

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

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – 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:* сумма флавоноидов в пересчете на изосалипурпозид – не менее 3 %.

Приготовление растворов.

Раствор СО изосалипурпозида. Около 0,025 г (точная навеска) СО изосалипурпозида растворяют в небольшом количестве спирта 96 % в мерной колбе вместимостью 25 мл, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор А СО изосалипурпозида).

1,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б СО изосалипурпозида).

Срок годности растворов не более 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

1,0 мл раствора А СО изосалипурпозида помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляют 2 мл алюминия хлорида раствора 2 % и 1 каплю уксусной кислоты разведенной, доводят объём раствора спиртом 96 % (раствор В СО изосалипурпозида). Раствор используют свежеприготовленным.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу с притертой пробкой вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл спирта 70 % и взвешивают, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной

бане в течение 1 ч. Затем содержимое колбы охлаждают, доводят при необходимости содержимое колбы до первоначальной массы, фильтруют через бумажный фильтр с красной полосой (раствор А испытуемого раствора).

1,0 мл раствора А испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 2 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 % и 1 каплю уксусной кислоты разведенной, доводят объём раствора спиртом 96 % и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора).

Оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора измеряют через 30 мин на спектрофотометре при длине волны 418 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл раствора А испытуемого раствора, 1 капли уксусной кислоты разведенной, доведенный спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 50 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора В СО изосалипурпозида. В качестве раствора сравнения используют раствор Б СО изосалипурпозида.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на изосалипурпозид в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 50 \cdot 50 \cdot 100 \cdot 100 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot 1 \cdot 25 \cdot 25 \cdot (100 - W) \cdot 100},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
A_0 – оптическая плотность раствора В СО изосалипурпозида;
a – навеска сырья, г;
a_o – навеска СО изосалипурпозида, г;
P – содержание основного вещества в СО изосалипурпозида, %;
W – влажность сырья, %.

Допускается содержание суммы флавоноидов в пересчете на изосалипурпозид вычислять с использованием удельного показателя

поглощения комплекса изосалипурпозида с алюминия хлоридом по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 50 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;

$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса изосалипурпозида с алюминия хлоридом при длине волны 418 нм, равный 500;

a – навеска сырья, г;

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».

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Бузины черной цветки	**ФС.2.5.0008.15**
Sambuci nigrae flores	**Взамен ГФ XI ст. 10**

Собранные в период цветения, высушенные и обмолоченные цветки и бутоны дикорастущего и культивируемого кустарника бузины черной – *Sambucus nigra* L., сем. бузиновых – *Sambucaceae* (жимолостных – *Caprifoliaceae*).

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Смесь отдельных цветков, бутонов на коротких голых цветоножках длиной до 2 – 3 мм и без них, частей соцветий. Цветки с пятизубчатой спайнолепестной чашечкой и венчиком из 4 – 5 лепестков, сросшихся у основания, диаметром до 8 мм. Диаметр бутонов – до 3 мм. Лепестки венчика широко-яйцевидные, почти округлые. Чашелистики треугольные, эллиптические или яйцевидные желтовато-зеленого цвета. Тычинок 5, приросших к трубке венчика, завязь почти шаровидная короткая полунижняя, трехгнездная. Цвет желтоватый или желтый. Запах специфический ароматный. Вкус водного извлечения пряный.

Измельченное сырье. При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны отдельные цельные цветки, бутоны на коротких голых цветоножках и без них, части цветков, бутонов и цветоножек, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.

Цвет желтоватый или желтый с беловато- или зеленовато-серыми вкраплениями. Запах специфический, ароматный. Вкус водного извлечения пряный.

Порошок. При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

стереомикроскопом (16×) видна смесь частиц цветков, бутонов и цветоножек, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Цвет желтоватый или желтый. Запах специфический, ароматный. Вкус водного извлечения пряный.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье, измельченное сырье*. При рассмотрении лепестка с поверхности должны быть видны многоугольные со слабоизвилистыми тонкими стенками клетки верхнего эпидермиса по краю с сосочковидными выростами; эпидермис нижней стороны лепестка характеризуется более крупными клетками с сильноизвилистыми стенками. Клетки эпидермиса по краю с сосочковидными выростами. Устьица только на нижней стороне лепестка, округлые, аномоцитного типа. Кутикула с обеих сторон лепестка морщинистая. Редко с нижней стороны лепестка (у его основания) могут встречаться простые и железистые волоски. Простые волоски одноклеточные, тонкостенные, со штриховатой кутикулой. Железистые волоски крупные с одно- и многоклеточной округлой или овальной головкой, различной формы на одно- и многоклеточной ножке.

Клетки верхнего эпидермиса чашелистика слегка вытянуты, с тонкими слабоизвилистыми стенками. Клетки эпидермиса с нижней стороны чашелистика более крупные, слегка вытянуты, с извилистыми тонкими стенками. Кутикула с обеих сторон морщинистая. Устьица расположены в основном с нижней стороны, округлые, аномоцитного типа. С верхней и нижней стороны чашелистика имеются сосочковидные выросты, особенно много их по краю. С нижней стороны чашелистика встречаются простые и железистые волоски. Простые волоски одноклеточные, тонкостенные, со штриховатой кутикулой. Железистые волоски крупные с одно- и многоклеточной головкой, различной формы на одно- и многоклеточной ножке. Пыльца трехбороздная, эллипсоидальная, гладкая.

Эпидермис цветоножки представлен вытянутыми прямоугольными клетками с ровными стенками, с овальными устьицами и нередко с сосочковидными выростами. Эпидермис цветоножки у основания цветка

обильно покрыт головчатыми и простыми волосками.

Порошок. При рассмотрении микропрепаратов должны быть видны: фрагменты эпидермиса лепестка с многоугольными слабоизвилистыми стеками клеток и сосочковидными выростами; фрагменты эпидермиса лепестка с сильноизвилистыми стенками клеток и округлыми устьицами, фрагменты эпидермиса чашелистика со слабоизвилистыми стенками клеток и округлыми устьицами; на эпидермисе лепестка и чашелистика видна складчатость кутикулы; отдельные простые и одноклеточные волоски с тонкими стенками и штриховатой кутикулой и головчатые волоски – крупные, с округлой или овальной одно- и многоклеточной головкой на одно- и многоклеточной ножке или фрагменты волосков; фрагменты эпидермиса цветоножки с прямоугольными клетками с ровными стенками, с овальными устьицами, сосочковидными выростами, могут быть с простыми и головчатыми волосками; трехбороздная эллипсоидальная гладкая пыльца.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

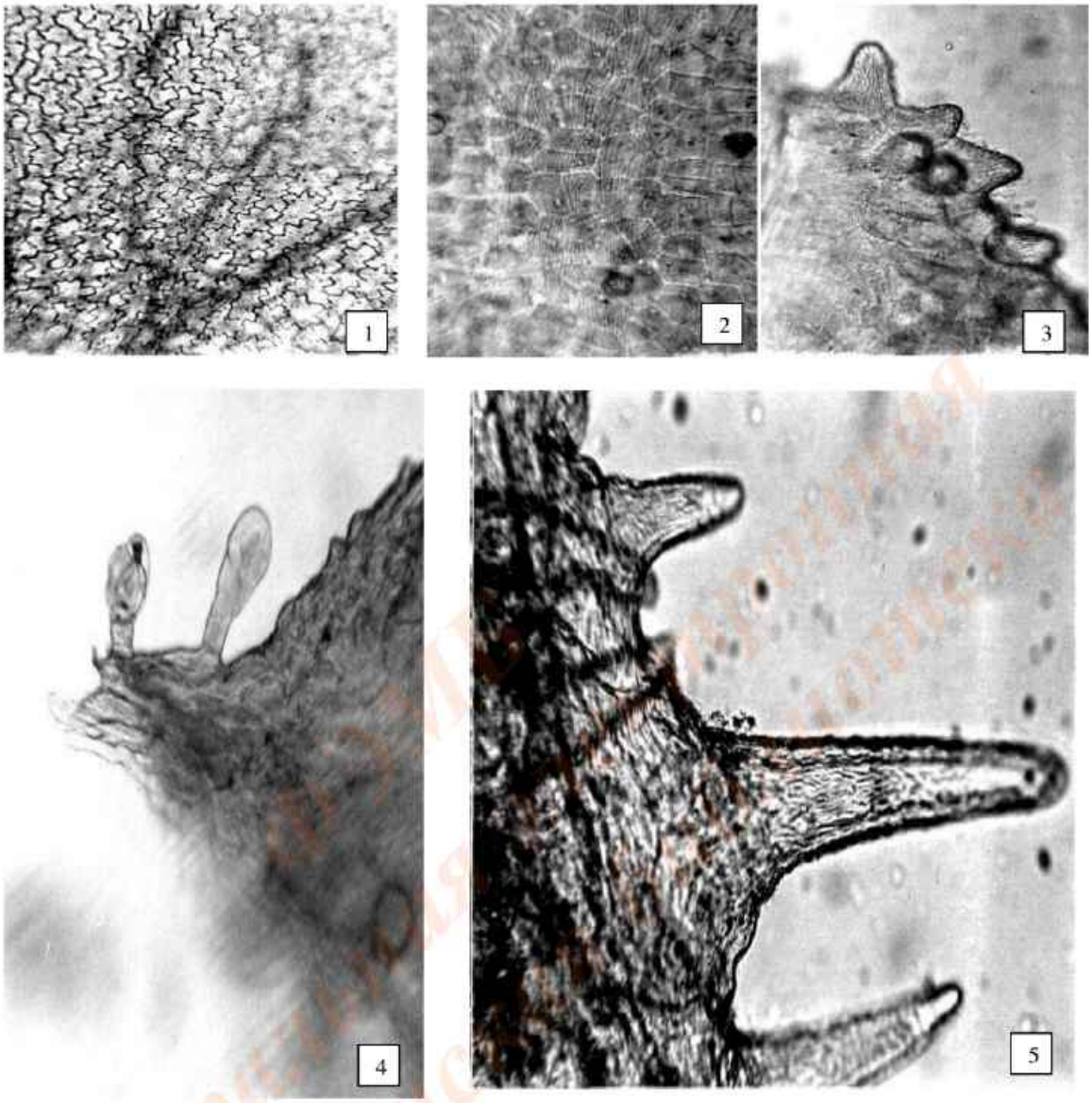


Рисунок – Бузины черной цветки.
1 – фрагмент нижнего эпидермиса лепестка со складчатой кутикулой (125×);
2 – фрагмент верхнего эпидермиса лепестка со складчатой кутикулой (250×);
3 – фрагмент чашелистика с сосочковидными выростами (250×);
4 – фрагмент чашелистика с головчатыми волосками (125×); 5 – фрагмент эпидермиса цветоножки с простыми волосками (250×).

Определение основных групп биологически активных веществ

1. ***Тонкослойная хроматография***

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля на алюминиевой подложке размером 10 × 10 см наносят 50 мкл испытуемого раствора (см. раздел «Количественное определение»

приготовление раствора А испытуемого раствора), рядом наносят 50 мкл раствора стандартного образца (СО) рутина (см. раздел «Количественное определение» приготовление раствора А СО рутина). Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную смесью растворителей этилацетат – метанол – вода (77:12:11), 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 просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм.

На хроматограмме испытуемого раствора в УФ-свете при длине волны 254 нм должны обнаруживаться 2 зоны адсорбции синего цвета ниже зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО рутина и 2 зоны адсорбции синего цвета выше зоны рутина.

Затем пластинку обрабатывают алюминия хлорида спиртовым раствором 2 %, выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100 °С в течение 2 – 3 мин и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме испытуемого раствора в УФ-свете при длине волны 365 нм должны обнаруживаться 2 зоны адсорбции с флуоресценцией ярко-желтого цвета ниже зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО рутина и 2 зоны адсорбции с флуоресценцией ярко-желтого цвета выше зоны рутина (флавоноиды).

2. Аналитическую пробу сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, в количестве 1,0 г помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 20 мл спирта 50 % и нагревают на водяной бане при температуре 60 °С в течение 15 мин. Затем извлечение охлаждают до комнатной температуры, фильтруют через бумажный фильтр и упаривают до 1 мл. К полученному извлечению прибавляют 1 мл спирта 96 %, 0,1 г порошка магния и 1 мл хлористоводородной кислоты концентрированной; постепенно появляется

розово-красное окрашивание (флавоноиды).

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:* измельченных частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; измельченных 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

Цветки, изменившие окраску. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 8 %.

Другие части растения (цветоносы, веточки, листья). *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 10 %.

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

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

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

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

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:* сумма флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 2 %; экстрактивных веществ, извлекаемых водой, – не менее 30 %.

Сумма флавоноидов

Приготовление растворов.

Раствор СО рутина. Около 0,05 г (точная навеска) СО рутина, высушенного в течение 3 ч при температуре 130 – 135 °С, растворяют при нагревании в спирте 70 % в мерной колбе вместимостью 50 мл. После охлаждения до комнатной температуры доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивают (раствор А СО рутина). Срок годности раствора 30 сут при хранении в прохладном защищенном от света месте.

1,0 мл раствора А СО рутина, 10 мл спирта 96 %, 0,5 мл уксусной кислоты раствора 30 %, 1,5 мл алюминия хлорида раствора 10 %, помещенных в мерную колбу вместимостью 25 мл и доведенных водой до метки (раствор Б СО рутина). Срок годности раствора 30 сут при хранении в прохладном защищенном от света месте.

Алюминия хлорида раствор 10 %. 10,0 г алюминия хлорида безводного или 18,0 г алюминия хлорида 6-водного растворяют в 80 мл воды, фильтруют в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем раствора водой до метки. Срок годности раствора 3 мес.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в круглодонную колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 60 мл спирта 70 %, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 45 мин. После охлаждения до комнатной температуры содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл, чтобы частицы сырья не попали на фильтр. В круглодонную колбу со

шлифом прибавляют 45 мл спирта 70 %, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 мин. После охлаждения до комнатной температуры извлечение фильтруют через тот же фильтр в ту же мерную колбу, доводят объем раствора в колбе спиртом 70 % до метки и тщательно перемешивают (раствор А испытуемого раствора).

5,0 мл раствора А испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора).

5,0 мл раствора Б испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 10 мл спирта 96 %, 0,5 мл уксусной кислоты раствора 30 %, 1,5 мл алюминия хлорида раствора 10 %, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и тщательно перемешивают (раствор В испытуемого раствора).

Оптическую плотность раствора В испытуемого раствора измеряют через 30 мин на спектрофотометре при длине волны 408 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 5 мл раствора Б испытуемого раствора, 10 мл спирта 96 %, 0,5 мл уксусной кислоты раствора 30 %, доведенный спиртом 70 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО рутина. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл раствора А СО рутина, 10 мл спирта 96 %, 0,5 мл уксусной кислоты раствора 30 %, доведенный спиртом 70 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в абсолютно сухом сырье в процентах в (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 25 \cdot a_0 \cdot 1 \cdot P \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 5 \cdot 5 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100 \cdot (100 - W)} \cdot 100,$$

где A – оптическая плотность раствора В испытуемого раствора;

A_o – оптическая плотность раствора Б СО рутина;
a – навеска сырья, г;
a_o – навеска СО рутина, г;
P – содержание основного вещества в СО рутина, %;
W – влажность сырья, %.

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

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1см}^{1\%} \cdot a \cdot 5 \cdot 5 \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствор В испытуемого раствора;
$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при длине волны 408 нм, равный 248;
a – навеска сырья, г;
W – влажность сырья, %.

Экстрактивные вещества. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1, навеска сырья 1,0 г, экстрагент - вода).

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».

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

Валерианы лекарственной корневища с корнями

ФС.2.5.0009.15

Valerianae officinalis rhizomata cum radicibus

Взамен ГФ X ст. 583
Взамен ГФ XI ст. 77
(изм. № 6 от 15.12.1999)

Собранные осенью или ранней весной, освобожденные от остатков листьев и стеблей, отмытые от земли и высушенные корневища с корнями многолетнего дикорастущего и культивируемого травянистого растения валерианы лекарственной – *Valeriana officinalis L. s. l.*, сем. валериановых – *Valerianaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Корневища цельные или разрезанные, длиной до 4 см, толщиной до 3 см, часто с рыхлой или полой с поперечными перегородками сердцевиной. От корневища отходят многочисленные придаточные корни, редко подземные побеги – столоны. Корни гладкие или слегка продольно-морщинистые, ломкие, различной длины, часто отделены от корневища.

Цвет корневищ и корней снаружи желтовато-коричневый, беловато-коричневый, коричневый, темно-коричневый, на изломе желтоватый, желтовато-белый, светло-коричневый, коричневый. Запах сильный, ароматный, вкус водного извлечения пряный, сладковато-горьковатый.

Измельченное сырье. При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки корневищ

различной формы и цилиндрические кусочки корней с гладкой или слегка продольно-морщинистой поверхностью, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.

Цвет кусочков желтовато-, серовато-, беловато-коричневый, коричневый или темно-коричневый. Запах сильный, ароматный. Вкус водного извлечения пряный, сладковато-горьковатый.

Порошок. При рассмотрении порошка под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки корней и корневищ различной формы с гладкой или слегка продольно-морщинистой поверхностью, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

Цвет желтовато-коричневый с беловато-коричневыми, желтовато-белыми, светло-коричневыми, коричневыми и темно-коричневыми вкраплениями. Запах сильный, ароматный. Вкус водного извлечения пряный, сладковато-горьковатый.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении микропрепаратов поперечного среза корня виден эпидермис (ризодерма), клетки которого образуют корневые волоски в виде коротких или удлиненных сосочков. Клетки прилегающей гиподермы крупные, часто с каплями эфирного масла. Кора широкая, состоит из однородных округлых паренхимных клеток, заполненных крахмальными зернами. Молодые корни имеют первичное строение: в центральном осевом цилиндре видно кольцо эндодермы, состоящей из клеток с утолщенными радиальными стенками, и группы сосудов. Редко встречаются старые корни с лучистой древесиной (вторичное строение).

На поперечном срезе корневища видна покровная ткань, представленная пробкой. Клетки паренхимы округлые, заполнены крахмальными зернами. По периметру нередко видны конусовидные зачатки корней. Открытые коллатеральные сосудисто-волокнистые пучки, часто искривленные, окружают одним, реже двумя кольцами сердцевину.

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

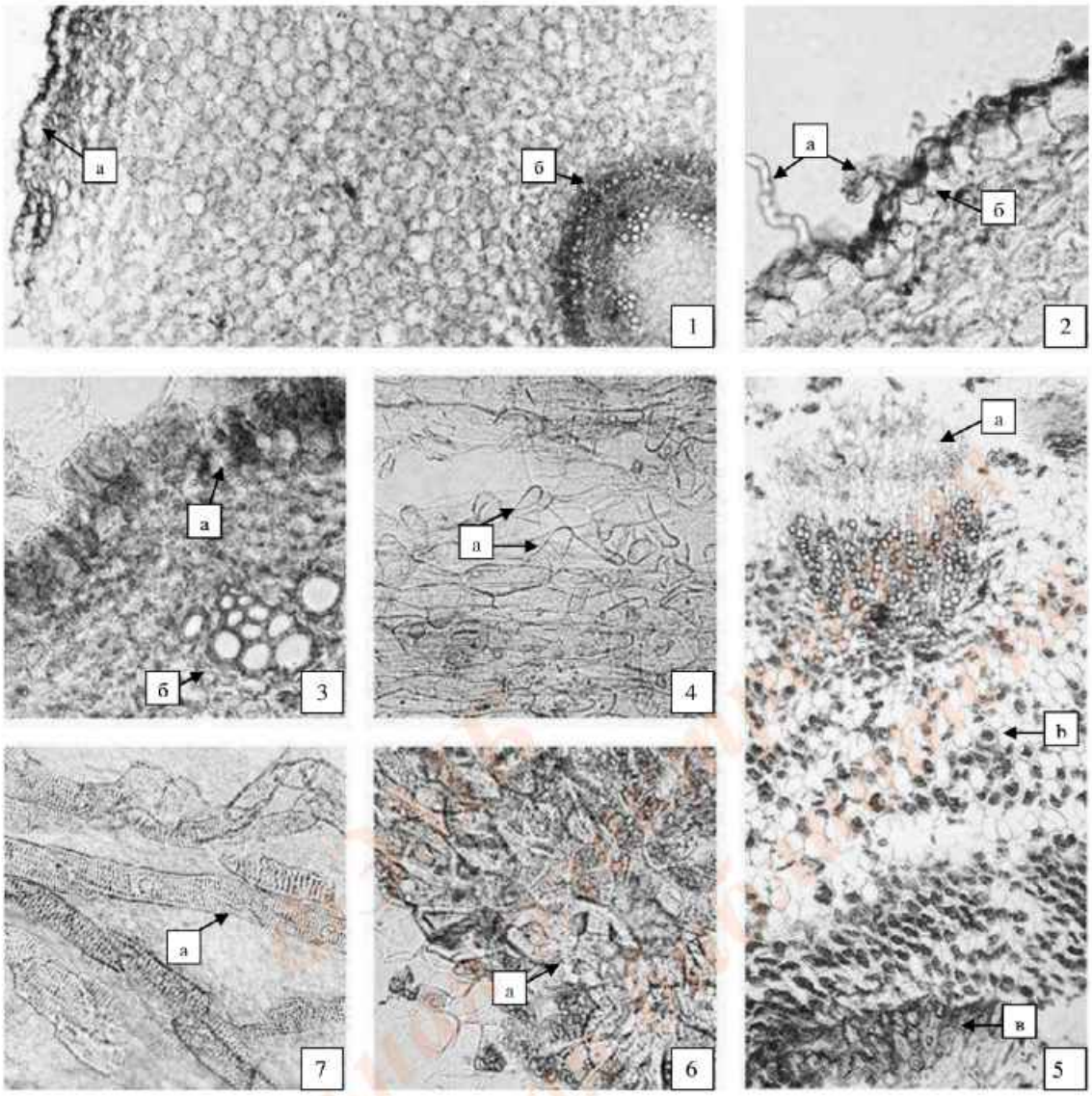


Рисунок – Валерианы лекарственной корневища с корнями.
1 – фрагмент поперечного среза корня первичного строения: а – ризодерма с прилегающей гиподермой, б – центральный осевой цилиндр (40×);
2 – фрагмент поперечного среза корня первичного строения: а – ризодерма с корневыми волосками, б – клетки гиподермы с каплями эфирного масла (200×); 3 – фрагмент поперечного среза корня первичного строения: а – клетки эндодермы, б – группа сосудов (200×); 4 – фрагмент корня: а – корневые волоски ризодермы (200×); 5 – фрагмент поперечного среза корневища: а – сосудистоволокнистый пучок, б – клетки паренхимы с крахмальными зернами, в – группа каменистых клеток в центре корневища (200×); 6 – фрагмент поперечного среза корневища: а – группа каменистых клеток (200×), 7 – фрагмент корневища: а – сетчатые сосуды с короткими искривленными члениками (200×).

В сердцевине располагается группа каменистых клеток, более старые корневища полые.

В препаратах соскоба сухого сырья должны быть видны крахмальные зерна простые и 2 – 5 - сложные, круглые или неправильной формы, что характерно для корневища.

Измельченное сырье, порошок. При рассмотрении давленного препарата должны быть видны группы паренхимных клеток, часто с каплями эфирного масла и/или коричневым содержимым; фрагменты ризодермы с корневыми волосками; фрагменты пробки, состоящей из клеток с утолщенными стенками; фрагменты сосудов с сетчатым, сетчато-лестничным и спиральным типами вторичного утолщения стенок; фрагменты паренхимы с зернами крахмала (в растворе глицерина или воде); изредка каменистые клетки.

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Анисового альдегида раствор. Смешивают последовательно 0,5 мл анисового альдегида, 10 мл уксусной кислоты ледяной, 85 мл спирта 96 % и 5 мл серной кислоты концентрированной. Срок годности раствора не более 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор стандартного образца (СО) судана красного G. Около 0,0025 г судана красного G растворяют в 10 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 6 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор СО флуоресцеина. Около 0,0025 г флуоресцеина растворяют в 10 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 6 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

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

На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором на алюминиевой подложке размером 10 × 10 см наносят в виде полос длиной 10 мм, шириной не более 3 мм 20 мкл испытуемого раствора, 5 мкл раствора СО судана красного G и 5 мкл раствора СО флуоресцеина. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре в течение 5 мин и помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 30 и не более 40 мин смесью растворителей ацетон – гексан (1:2), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет не менее 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры и сушат до удаления следов растворителей. Затем пластинку обрабатывают анисового альдегида раствором, выдерживают в сушильном шкафу при 100 – 105 °С в течение 2 – 3 мин и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО флуоресцеина должна обнаруживаться зона адсорбции светло-желтого цвета, на хроматограмме раствора СО судана красного G должна обнаруживаться зона адсорбции розово- или фиолетово-красного цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться 2 зоны адсорбции синего или фиолетово-синего цвета, расположенные между зонами флуоресцеина (снизу) и судана красного G (сверху) (ацетоксивалереновая и валереновая кислоты); допускается обнаружение других зон адсорбции выше и ниже указанных.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 15 %.

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

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 10 %.

Депонированная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье:* 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 %.

Посторонние примеси

Другие части валерианы (остатки стеблей и листьев, в том числе отделенные при анализе), а также старые отмершие корневища. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 5 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 2 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье* – не более 3 %, *измельченное сырье, порошок* – не более 2 %.

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:* экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 70 %, – не менее

25 %; суммы сесквитерпеновых кислот в пересчете на валереновую кислоту – не менее 0,12 %.

Сумма сесквитерпеновых кислот

Приготовление растворов.

Фосфорная кислота концентрированная раствор 5,0 г/л в воде. Аликвоту фосфорной кислоты концентрированной, взятую по массе или по объему, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 1000 мл, доводят водой для хроматографии до метки и перемешивают. При необходимости проводят дегазацию и фильтрацию через мембранный фильтр с размером пор не более 0,45 мкм.

Раствор СО валереновой кислоты. Около 0,005 г (точная навеска) СО валереновой кислоты растворяют в спирте 96 % в мерной колбе вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор А).

1,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают. Раствор используют без фильтрования (раствор Б). Срок годности раствора 3 мес при хранении в хорошо укупоренной упаковке, в прохладном защищенном от света месте.

Проверка пригодности хроматографической системы.

Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки должна быть не менее 4000 теоретических тарелок для пика ацетоксивалереновой кислоты и не менее 15000 для пика валереновой кислоты;
- коэффициент симметрии для пиков ацетоксивалереновой и валереновой кислот должен быть не менее 0,8 и не более 1,5.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм. Около 1,5 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл спирта 96 %, присоединяют к обратному холодильнику и кипятят в течение 45 мин на водяной бане. Охлажденное до комнатной температуры извлечение фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят спиртом 96 % до метки и тщательно перемешивают.

Около 2 - 3 мл полученного извлечения фильтруют через мембранный нейлоновый фильтр (размер пор 0,45 мкм), отбрасывая 1 – 2 мл фильтрата (испытуемый раствор).

Условия хроматографирования

Колонка	125 × 4,0 мм, сорбент октадецилсилилсиликагель (С18), 5 мкм
Предколонка	4 × 4 мм, сорбент октадецилсилилсиликагель (С18), 5 мкм
Подвижная фаза	**А** - ацетонитрил; **В** - фосфорной кислоты концентрированной раствор 5,0 г/л в воде.
Способ элюирования	программа градиента

Время, мин	**А, об. %**	**В, об. %**
0 – 5	47	53
5 – 7	47→50	53→50
7 – 9	50	50
9 – 16	50→60	50→40
16 – 20	60	40
20 – 25	60→100	40→0
25 – 30	100→47	0→53
30 – 45	47	53

Скорость потока, мл/мин	1
Температура колонки, °С	комнатная (20 ± 2)
Детектор	спектрофотометрический или диодная матрица
Длина волны, нм	220
Объем вводимой пробы, мкл	10
Время хроматографирования, мин	20

Хроматографируют раствор СО валереновой кислоты, получая не менее 3 хроматограмм. Результаты считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Хроматографируют попеременно испытуемый раствор и раствор СО валереновой кислоты, получая не менее 3 хроматограмм. Расчет содержания суммы сесквитерпеновых кислот проводят методом внешнего стандарта. Обсчету подлежат основной пик валереновой кислоты и пик с относительным временем удерживания (по валереновой кислоте).

Содержание суммы сесквитерпеновых кислот в пересчете на валереновую кислоту в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 50 \cdot P \cdot 100 \cdot 100}{S_0 \cdot 25 \cdot 10 \cdot a \cdot 100 \cdot (100 - W)},$$

где S – площадь пика валереновой и ацетоксивалереновой кислот на хроматограмме испытуемого раствора;
a – навеска сырья, г;
a_0 – навеска СО валереновой кислоты, г;
P – содержание основного вещества в СО валереновой кислоты, %;
S_0 – площадь пика на хроматограмме раствора СО валереновой кислоты;
W – влажность сырья, %.

Экстрактивные вещества. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1, экстрагент – спирт 70 %).

Примечание. Сумму сесквитерпеновых кислот определяют для сырья, предназначенного для получения лекарственных растительных препаратов (пачки, фильтр-пакеты) и экстрактов; экстрактивные вещества, извлекаемые спиртом 70 %, определяют для сырья, предназначенного для получения экстрактов.

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».

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Гинкго двулопастного листья	**ФС.2.5.0010.15**
Ginkgo biloba folia	**Вводится впервые**

Собранные в течение вегетационного периода и высушенные листья многолетнего культивируемого древесного растения гинкго двулопастного – *Ginkgo biloba* L., сем. гинкговых – *Ginkgoaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Цельные или частично измельченные черешковые листья без прилистников светло-зелёного, желтовато-зеленого или желтого цвета, в очертании листовой пластинки веерообразные, на верхушке двулопастные с дихотомическим жилкованием и низбегающим основанием, кожистые, голые, слегка гофрированные по краю. Размер листьев варьирует от 4 до 10 см. Изредка встречаются части укороченных побегов. Листовая пластинка рассечена и имеет сверху глубокий V-образный вырез, рассекающий пластинку на 2 симметричные половинки. Запах характерный. Вкус водного извлечения специфический, кисловатый, слегка вяжущий с горьким послевкусием.

Измельчённое сырьё. При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки цельнокрайних листовых пластинок, черешков различной величины и формы, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет сырья зелёный, желтовато-зеленый или желтый. Запах характерный. Вкус водного извлечения специфический, кисловатый, слегка вяжущий с горьким послевкусием.

Микроскопические признаки. *Цельное и измельченное сырье.* При рассмотрении листа с поверхности видны клетки верхнего и нижнего

эпидермиса неправильной, вытянутой формы, клетки верхнего эпидермиса с сильноизвилистым краем и чётковидно-утолщенными стенками; устьица встречаются только на нижней стороне листа и расположены группами по 2 – 4, замыкающие клетки устьиц содержат крахмал. На поперечном срезе листовой пластинки видна кутикула с обеих сторон листа. Под эпидермисом находится мезофилл. Мезофилл состоит из однотипных паренхимных клеток округлой, изодиаметрической формы с небольшими межклетниками; содержит хлоропласты, крахмальные зерна, вместилища. Клетки эпидермиса черешка листа, расположенные над жилкой прозенхимной формы, сильно вытянутые вдоль жилки, а между жилками – паренхимные. Под эпидермисом находится 2-3-слойная гиподерма, состоящая из плотно сомкнутых клеток с сильно утолщенными одревесневшими оболочками. На поперечном срезе черешка видны 2 пучка, ограниченные клетками паренхимы, а также вместилища; клетки хлоренхимы черешка округлой изодиаметрической формы. На продольном срезе черешка в основной паренхиме видны крупные друзы, а между гиподермой и ксилемой – друзы небольшого размера. Ксилема черешка представлена кольчатыми сосудами и сосудами с окаймленными порами.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

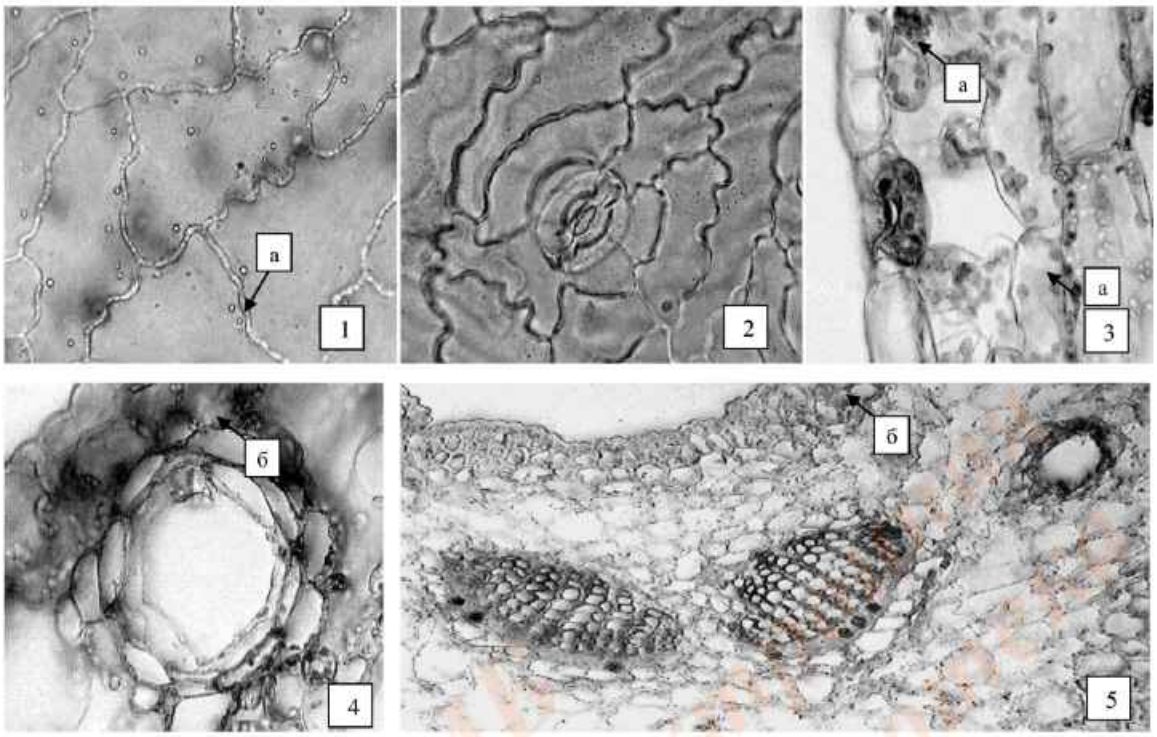


Рисунок – Гинкго двулопастного листья.
1 – фрагмент верхнего эпидермиса (400×); 2 – фрагмент нижнего эпидермиса с устьицами аномоцитного типа (400×); 3 – фрагмент продольного среза листовой пластины с устьичным комплексом (а) (400×); 4 – фрагмент поперечного среза листовой пластины: выстилающие клетки (а), полость вместилища (б) (400×); 5 – фрагмент радиального среза черешка листа: смоляной ход (а), проводящий пучок (б) (100×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором на алюминиевой подложке размером 10×15 см наносят 10 мкл испытуемого раствора (см. раздел «Количественное определение» приготовление раствора А испытуемого раствора) и рядом 10 мкл раствора стандартного образца (СО) рутина (см. раздел «Количественное определение» приготовление раствор А СО рутина). Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 24 ч смесью растворителей хлороформ – метанол – вода (26:14:3), и хроматографируют

восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться 2 зоны адсорбции фиолетового цвета, расположенные выше зоны на хроматограмме раствора СО рутина.

Затем пластинку обрабатывают раствором диазореактива и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться 2 зоны адсорбции желто-оранжевого цвета, расположенные выше зоны на хроматограмме раствора СО рутина.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 12 %.

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

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 5 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье:* 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 %.

Посторонние примеси

Части укороченных побегов. *Цельное сырье* – не более 2 %.

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

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – 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».

Федеральная электронная медицинская библиотека

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:* сумма флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 0,5 %.

Приготовление растворов.

Раствор СО рутина. Около 0,025 г (точная навеска) предварительно высушенного до постоянной массы при температуре 100 – 105 °С СО рутина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 30 мл спирта 70 % при нагревании на водяной бане. После охлаждения до комнатной температуры содержимое колбы доводят спиртом 70 % до метки и перемешивают (раствор А СО рутина). Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

1,0 мл раствора А СО рутина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 1 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 % и 1 каплю уксусной кислоты разбавленной 30 %, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б СО рутина). Срок годности раствора 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, приливают 30 мл спирта 70 % и взвешивают с точностью до ± 0,01 г. Колбу с содержимым присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 1 ч. После охлаждения до комнатной температуры колбу взвешивают, доводят ее содержимое спиртом 70 % до первоначальной массы, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр «красная полоса» (раствор А испытуемого раствора).

1,0 мл раствора А испытуемого раствора помещают в мерную колбу

вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 % и 1 каплю уксусной кислоты разбавленной 30 %, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора).

Оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора измеряют через 40 мин на спектрофотометре при длине волны 406 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл раствора А испытуемого раствора, 1 капли уксусной кислоты разбавленной 30 %, доведенный спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО рутина. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл раствора А СО рутина, 1 капли уксусной кислоты разбавленной 30 %, доведенный спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 30 \cdot 25 \cdot P \cdot 100}{A_0 \cdot 50 \cdot 25 \cdot a \cdot 1 \cdot 100 \cdot (100 - W)} \cdot 100,$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
A_o – оптическая плотность раствора Б СО рутина;
a – навеска сырья, г;
a_o – навеска СО рутина, г;
P – содержание основного вещества в СО рутина, %;
W – влажность сырья, %.

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

$$X = \frac{A \cdot 30 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot 25 \cdot a \cdot 100 \cdot (100 - W)} \cdot 100,$$

где A - оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;

$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при длине волны 406 нм, равный 190;
a – навеска сырья, г;
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».

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

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 обратнояйцевидные, 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

Федеральная электронная медицинская библиотека ФГБУ «ВНМЦ» Минздрава России

(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.

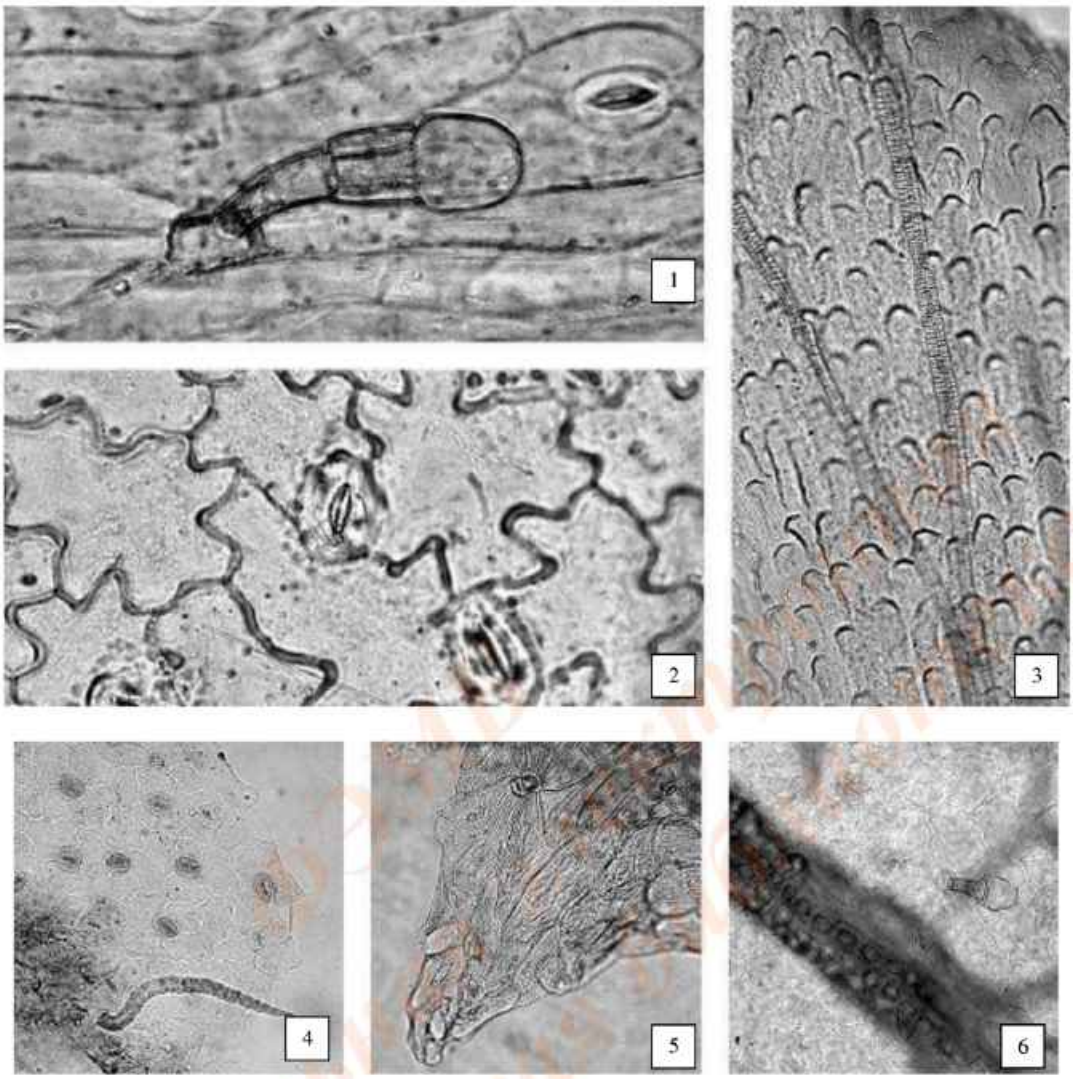


Рисунок – Донника трава.
1 – фрагмент эпидермиса стебля с головчатым волоском (400×); 2 – клетки нижнего эпидермиса листа с извилистыми стенками, устьица аномоцитного типа (400×); 3 – фрагмент лепестка (наружная сторона): клетки эпидермиса с сосочковидными выростами (400×); 4 – простой одноклеточный 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-зеленного 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.

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. Срок годности раствора 7 сут при хранении в хорошо укупоренной упаковке, в прохладном защищенном от света месте.

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. Срок годности раствора 30 сут при хранении в хорошо укупоренной упаковке, в прохладном защищенном от света месте.

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, эндкеппированный октадецилсилил (C_{18}) силикагель для хроматографии, 5 мкм.
Предколонка	4 × 4 мм, эндкеппированный октадецилсилил (C_{18}) силикагель для хроматографии, 5 мкм.
Подвижная фаза	Ацетонитрила раствор 25 % в фосфорной кислоты растворе 0,3 %. Фосфорной кислоты раствор 0,3 %.
Скорость потока, мл/мин	1
Температура колонки, °С	комнатная (20 ± 2)
Детектор	диодная матрица или спектрофотометрический;

Федеральная электронная медицинская библиотека

	длина волны 275 нм
Объем вводимой пробы, мкл	10
Время хроматографирования, 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».

Душицы обыкновенной трава	**ФС.2.5.0012.15**
Origani vulgaris herba	**Взамен ГФ XI ст. 55**
	(изм. № 1 от 16.06.1999)

Собранная во время цветения, высушенная трава многолетнего культивируемого и дикорастущего травянистого растения душицы обыкновенной – *Origanum vulgare* L., сем. яснотковых – *Lamiaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Цельные или частично измельченные цветоносные, олиственные стебли длиной до 20 см. Листья супротивные, черешковые, продолговато-яйцевидные, к верхушке заостренные, мелкозубчатые или почти цельнокрайние длиной 2 – 4 см, с белесыми волосками, расположенными, в основном, по жилкам, и коричневатыми блестящими точками (погруженные железки), главным образом, с нижней стороны. Стебли четырехгранные, опушенные или почти голые, вверху разветвленные. Соцветия щитковидно-метельчатые на концах ветвей, раскидистые, многоцветковые, состоят из компактных или удлиненно-колосовидных полумутовок, на цветоносах видны блестящие мелкие округлые железки. Прицветники длиннее чашечки, продолговатые или яйцевидные, острые, без железок. Чашечка с треугольно-ланцетовидными зубцами, снаружи с редкими волосками, блестящими округлыми железками и торчащими из зева белесыми волосками, которые растут с внутренней стороны чашечки по линии вдоль оснований зубцов. Цветки длиной 3 – 5 мм, венчик двугубый, слегка опушенный. Семена мелкие, длиной около 1 мм, округлые с заостренным кончиком.

Цвет листьев сверху – зеленый, иногда с фиолетовым оттенком, снизу – светло-зеленый; стеблей – зеленый, коричневато-зеленый, редко – светло-коричневый, как правило, с фиолетовым оттенком; цвет прицветников – зеленовато-фиолетовый, чашечки – зеленовато-фиолетовый или фиолетовый; венчика – коричневато-розовый, реже коричневый; семян – коричневый или светло-коричневый. Запах ароматный. Вкус водного извлечения горьковато-пряный, слегка вяжущий.

Измельченное сырье. Кусочки стеблей, часто продольно-расщепленных, листьев, а также отдельные цветки и семена, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.

При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки стеблей зеленых, коричневато-зеленых или светло-коричневых, часто с фиолетовым оттенком, нередко продольно-расщепленных с беловатой губчатой сердцевиной; кусочки зеленых листьев с блестящими коричневатыми точками (погруженные железки) и белесыми волосками; цельные зеленовато-фиолетовые или фиолетовые чашечки или их кусочки с железками и редкими волосками снаружи и длинными белесыми волосками на уровне зубцов с внутренней стороны; кусочки коричневого или коричневато-розового венчика с белесыми волосками; мелкие округлые коричневые или светло-коричневые семена.

Цвет измельченного сырья зеленый, серовато-зеленый с белыми, коричневыми, фиолетовыми, коричневато-фиолетовыми, беловато-зелеными и розовыми вкраплениями. Запах ароматный. Вкус водного извлечения горьковато-пряный, слегка вяжущий.

Порошок. Смесь кусочков стеблей, листьев и цветков, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

При рассмотрении порошка под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки стеблей зеленых, коричневато-зеленых или светло-

коричневых, часто с фиолетовым оттенком, нередко продольно-расщепленных с беловатой губчатой сердцевиной; кусочки зеленых листьев с блестящими коричневатыми точками (погруженные железки) и белесыми волосками; цельные зеленовато-фиолетовые или фиолетовые чашечки или их кусочки с железками и редкими волосками снаружи и длинными белесыми волосками на уровне зубцов с внутренней стороны; кусочки коричневого или коричневато-розового венчика с белесыми волосками; мелкие округлые коричневые или светло-коричневые семена.

Цвет порошка коричневато-зеленый с фиолетовыми, белыми, коричневыми и розовыми вкраплениями. Запах ароматный. Вкус водного извлечения горьковато-пряный, слегка вяжущий.

Микроскопические признаки. *Цельное, измельченное сырье.* При рассмотрении микропрепаратов с поверхности должны быть видны клетки эпидермиса верхней стороны листа со слабоизвилистыми стенками, нижней стороны листа – с более извилистыми стенками; стенки клеток нередко четковидно-утолщенные. Устьица на обеих сторонах листа окружены 2 клетками эпидермиса, смежные стенки которых расположены перпендикулярно устьичной щели (диацитный тип). Волоски 2 типов (простые и головчатые) расположены по всей пластинке листа, в большем количестве – на нижней его стороне. Простые волоски, главным образом, многоклеточные, с бородавчатой поверхностью и утолщенными стенками (у крупных волосков часто одна или более клеток спавшиеся); головчатые волоски на одноклеточной ножке с овальной одноклеточной головкой. Округлые эфирномасличные железки, у которых можно иногда видеть 8 радиально расположенных выделительных клеток, преобладают на нижней стороне листа и находятся в углублении ниже уровня эпидермиса (погруженные), у места прикрепления железки эпидермальные клетки образуют розетку, как правило, из 10 – 16 клеток. Клетки эпидермиса стебля почти многоугольные, вытянутые, волоски и устьица характерного строения, железки мелкие, редко встречаются ветвистые многоклеточные волоски.

Эпидермис наружной поверхности чашечки с редкими устьицами, многочисленными простыми 2 – 3-клеточными волосками и крупными железками; с внутренней стороны чашечки клетки эпидермиса сильноизвилистые с хорошо заметной складчатостью кутикулы, по всей поверхности – мелкие головчатые волоски, по линии вдоль оснований зубцов расположены длинные многоклеточные волоски с бородавчатой кутикулой; в нижней части чашечки видны сосудистые пучки, окруженные пористыми толстостенными одревесневшими склеренхимными волокнами. Клетки эпидермиса венчика с наружной стороны извилистые, на лопастях видны многоклеточные волоски и редкие непогруженные железки; с внутренней стороны лопасти покрыты сосочковидными выростами, среди которых иногда встречаются пальцевидные волоски со штриховатой кутикулой, в средней трети венчика эти волоски многочисленные. В покровной ткани пыльников видны клетки с лучистым утолщением стенок; пыльцевые зерна – сферические, со слегка бородавчатой экзиной и 6 порами.

Порошок. При рассмотрении микропрепаратов должны быть видны: фрагменты эпидермиса листа, состоящее из клеток с прямыми или извилистыми, нередко четковидно-утолщенными стенками; устьица диацитного типа; округлые эфирномасличные железки, у которых иногда заметны 8 радиально расположенных выделительных клеток; вокруг железок эпидермальные клетки образуют розетку; на листе железки – погруженные, на чашечке и венчике – непогруженные, иногда деформированные; волоски многочисленные: простые волоски 1 – 5-клеточные, иногда ветвистые, с утолщенными стенками и бородавчатой поверхностью, нередко обломаны и видны только их основания, головчатые волоски на одноклеточной ножке с овальной одноклеточной головкой; для фрагментов цветка (чашечки и венчика) характерны те же трихомы, что и для листьев; фрагменты венчика с сосочковидными выростами или извилистостенными клетками эпидермиса; фрагменты чашечки с многочисленными длинными белесыми волосками вдоль зубцов; фрагменты покровной ткани незрелых семян с эпидермисом из

сосочковидных тонкостенных клеток и мезокарпием из клеток с толстыми пористыми извилистыми стенками; для сферических пыльцевых зерен характерна слегка бородавчатая экзина и 6 пор.

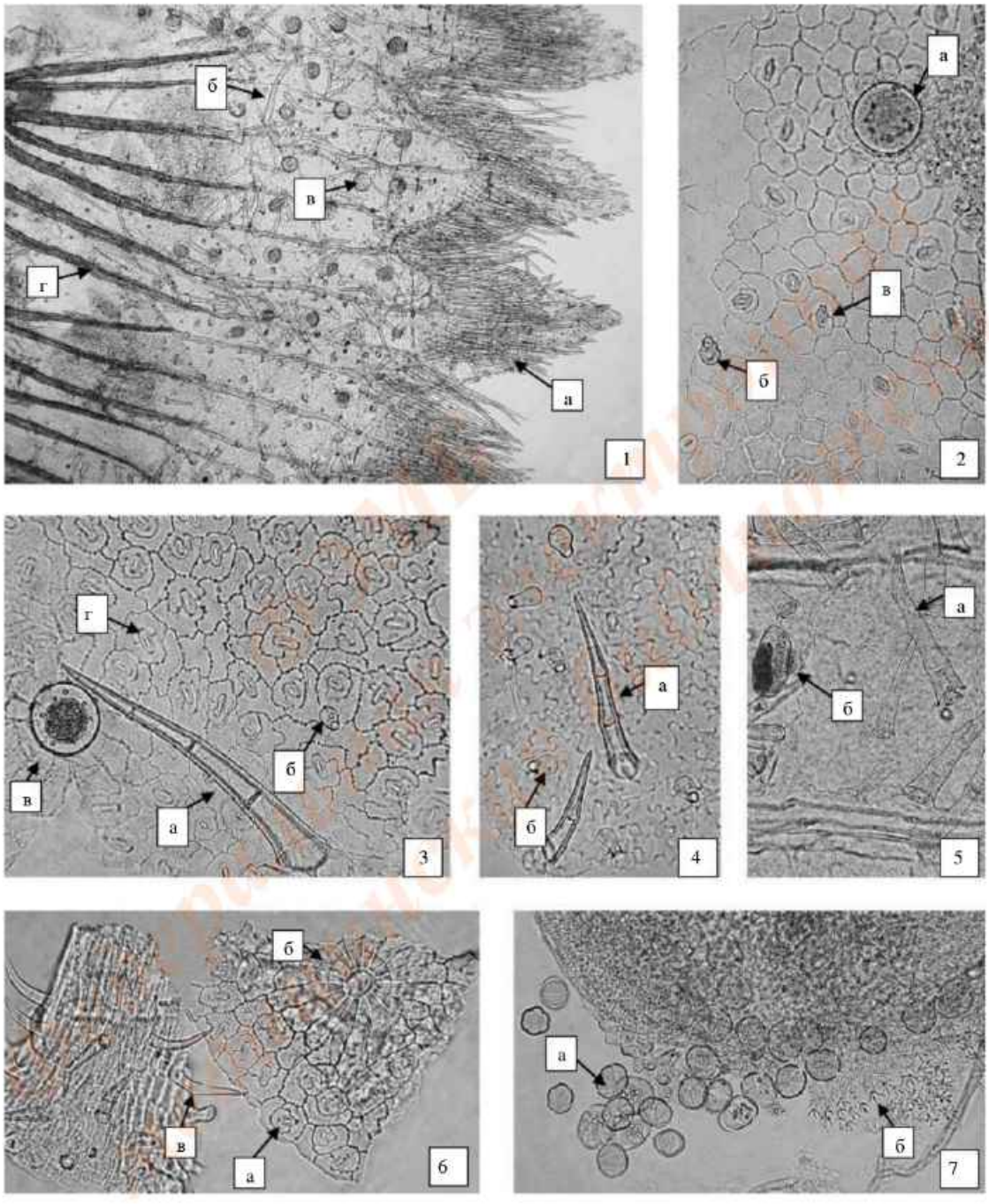


Рисунок – Душицы трава.

1 – фрагмент чашечки с наружной стороны: а – многоклеточные волоски, просвечивающиеся с внутренней стороны зева, б – многоклеточный волосок с наружной стороны, в – железка, г – склеренхимные одревесневшие волокна

(40×); 2 – фрагмент эпидермиса верхней стороны листа: а – железка, б – головчатый волосок, в – устьица диацитного типа (200×); 3 – фрагмент эпидермиса нижней стороны листа: а – многоклеточный волосок, б – головчатый волосок, в – железка, г – устьица диацитного типа (200×); 4 – фрагмент эпидермиса прицветного листа: а – многоклеточный волосок, б – головчатый волосок (200×); 5 – фрагмент чашечки с наружной стороны: а – многоклеточный волосок, б – непогруженная железка (200×); 6 – фрагмент эпидермиса листа: а – устьица диацитного типа, б – железка с розеткой клеток вокруг, в – простой волосок фрагмента эпидермиса прицветного листа (200×); 7 – фрагмент пыльника: а – сферическая пыльца с шестью порами, б – клетки с лучистым утолщением стенок (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор для детектирования 1. Дифенилборилоксиэтиламина раствор спиртовой 1 %. 1 г дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира растворяют в 100 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор для детектирования 2. Полиэтиленгликоля (ПЭГ) 400 раствор спиртовой 5 %. 5 мл ПЭГ 400 смешивают со 100 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 6 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор стандартного образца (СО) рутина. Около 0,001 г СО рутина (рутина тригидрата) растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора 3 мес при хранении в хорошо укупоренной упаковке в прохладном защищенном от света месте.

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

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля на полимерной подложке размером 10 × 10 см в виде полос длиной 10 мм, шириной не более 3 мм наносят по 20 мкл испытуемого раствора и 20 мкл раствора СО рутина. Пластинку с нанесенными пробами

сушат при комнатной температуре, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин смесью растворителей толуол – этилацетат – муравьиная кислота безводная – вода (10:20:5:2), 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. Пластинку выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100 – 105 °С в течение 2 – 3 мин, еще теплую обрабатывают последовательно раствором для детектирования 1, раствором для детектирования 2 и через 30 мин просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО рутина должна обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией желто-оранжевого или оранжевого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией желто-оранжевого цвета выше зоны рутина, зона выше – синего или фиолетово-синего цвета, зона выше – ярко-голубого или голубого цвета со слабым светло-зеленым оттенком, над ней зона голубовато-синего цвета; допускается обнаружение других зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 13 %.

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

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 5 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье:* 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 %.

Посторонние примеси

Сырье, изменившее окраску (потемневшее и почерневшее). *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 7 %.

Кусочки стеблей и боковых веточек, в том числе отделенные при анализе*. Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 40 %.

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

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

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:* сумма флавоноидов в пересчете на лютеолин – не менее 0,8 %; *цельное сырье*: эфирного масла – не менее 0,1 %, *измельченное сырье, порошок:* эфирного масла – не менее 0,08 %,

Сумма флавоноидов

Приготовление растворов.

Раствор СО лютеолина. Около 0,01 г (точная навеска) СО лютеолина, предварительно высушенного при температуре 130 – 135 °С в течение 3 ч,

растворяют в 25 мл спирта 96 % в мерной колбе вместимостью 50 мл при нагревании на кипящей водяной бане, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор А СО лютеолина). Срок годности раствора не более 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

1,0 мл раствора А СО лютеолина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 3 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 % и 0,1 мл уксусной кислоты концентрированной, доводят раствор до метки спиртом 96 % и перемешивают (раствор Б СО лютеолина).

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм. Около 0,80 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл спирта 60 %, колбу взвешивают с погрешностью $\pm$ 0,01 г, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 1,5 ч. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры и взвешивают, при необходимости доводят содержимое колбы спиртом 60 % до первоначальной массы. Содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр, отбрасывая первые 25 мл фильтрата (раствор А испытуемого раствора).

1,0 мл раствора А испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 3 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 % и 0,1 мл уксусной кислоты концентрированной, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора).

Оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора измеряют через 40 мин на спектрофотометре при длине волны 400 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл раствора А испытуемого раствора и 0,1 мл уксусной кислоты концентрированной, доведенный спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО лютеолина в тех же условиях. В качестве раствора сравнения используют

раствор, состоящий из 1 мл раствора А СО лютеолина, 0,1 мл уксусной кислоты концентрированной, доведенный спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 50 \cdot 25 \cdot P \cdot 100}{A_0 \cdot 50 \cdot 25 \cdot a \cdot 1 \cdot 100 \cdot (100 - W)} \cdot 100,$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
A_o – оптическая плотность раствора Б СО лютеолина;
a – навеска сырья, г;
a_o – навеска СО лютеолина, г;
P – содержание основного вещества в СО лютеолина, %;
W – влажность сырья, %.

Допускается содержания суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин вычислять с использованием удельного показателя поглощения комплекса лютеолина с алюминия хлоридом.

$$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1см}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса лютеолина с алюминия хлоридом при длине волны 400 нм, равный 549,41;
a – навеска сырья, г;
W – влажность сырья, %.

Эфирное масло. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 2, из 25,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, время перегонки 2 ч).

Примечания

1. Содержание эфирного масла определяют в сырье, предназначенном для получения эфирного масла.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

2. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин определяют в сырье, предназначенном для получения водных, спиртовых, спирто-водных извлечений, экстрактов.

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».

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Женьшеня настоящего корни	**ФС.2.5.0013.15**
Panacis ginseng radices	**Взамен ГФ X ст. 572**
	Взамен ГФ XI ст. 66

Собранные в конце августа – начале сентября и высушенные корни дикорастущего и культивируемого многолетнего травянистого растения женьшеня настоящего – *Panax ginseng C. A. Mey*, сем. аралиевых – *Araliaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Корни длиной до 25 см, толщиной 0,7 – 2,5 см, с 2 – 5 крупными разветвлениями, реже – без них. Корни стержневые, продольно-, реже спиральноморщинистые, хрупкие, излом ровный. «Тело» корня утолщенное, почти цилиндрическое, сверху с ясно выраженными кольцевыми утолщениями. В верхней части корня имеется суженное поперечно-морщинистое корневище – «шейка». Корневище короткое с несколькими рубцами от опавших стеблей, наверху образует «головку», представляющую собой расширенный остаток стебля и верхушечную почку (иногда 2 – 3). От «шейки» иногда отходят один или несколько придаточных корней. «Шейка» и «головка» могут отсутствовать. Цвет корней с поверхности и на разрезе желтовато-белый, на свежем изломе белый. Запах специфический. Вкус водного извлечения сладкий, жгучий, затем пряно-горьковатый.

Измельченное сырье. При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки корней различной формы, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет с

поверхности и на изломе желтовато-белый. Запах специфический. Вкус водного извлечения сладкий, жгучий, затем пряно-горьковатый.

Порошок. При рассмотрении порошка под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видна смесь измельченных частиц корней разнообразной формы желтовато-белого цвета, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Запах специфический. Вкус водного извлечения сладкий, жгучий, затем пряно-горьковатый.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* На поперечном срезе главного корня видны узкий слой светло-коричневой пробки, широкая кора, четкая линия камбия и древесина.

Главный корень покрыт перидермой, клетки которой тонкостенные и лигнифицированные, неопробковевшие. Флоэма и ксилема разделены камбиальной зоной, которая проходит примерно через середину радиуса корня и иногда не просматривается. К периферии от первичной ксилемы отходят крупноклеточные первичные радиальные лучи паренхимной ткани, между которыми находится вторичная ксилема, пересеченная многочисленными вторичными радиальными лучами основной паренхимы. Ксилема состоит из тонкостенных паренхимных клеток, содержащих крахмальные зерна. Сосуды сердцевинных лучей имеют утолщенные одревесневшие стенки и расположены поодиночке или собраны по 3 – 6 в группы. В паренхиме древесины изредка встречаются клетки, содержащие желтые пигменты. В центре корня есть нечетко диагностируемые остатки первичной ксилемы в виде 2 лучей. Флоэма состоит, главным образом, из мелкоклеточных элементов, в ней находятся хорошо заметные схизогенные вместилища, содержащие капельки секрета от светло-желтого до красно-коричневого цвета. Крахмальные зерна мелкие, округлые, простые. В отдельных клетках паренхимы содержатся друзы оксалата кальция. Наружная часть вторичной коры граничит с зоной из нескольких (4 – 6) рядов крупных тангентально-вытянутых паренхимных клеток феллодермы, округлых или овальных, имеющих слегка утолщенную оболочку.

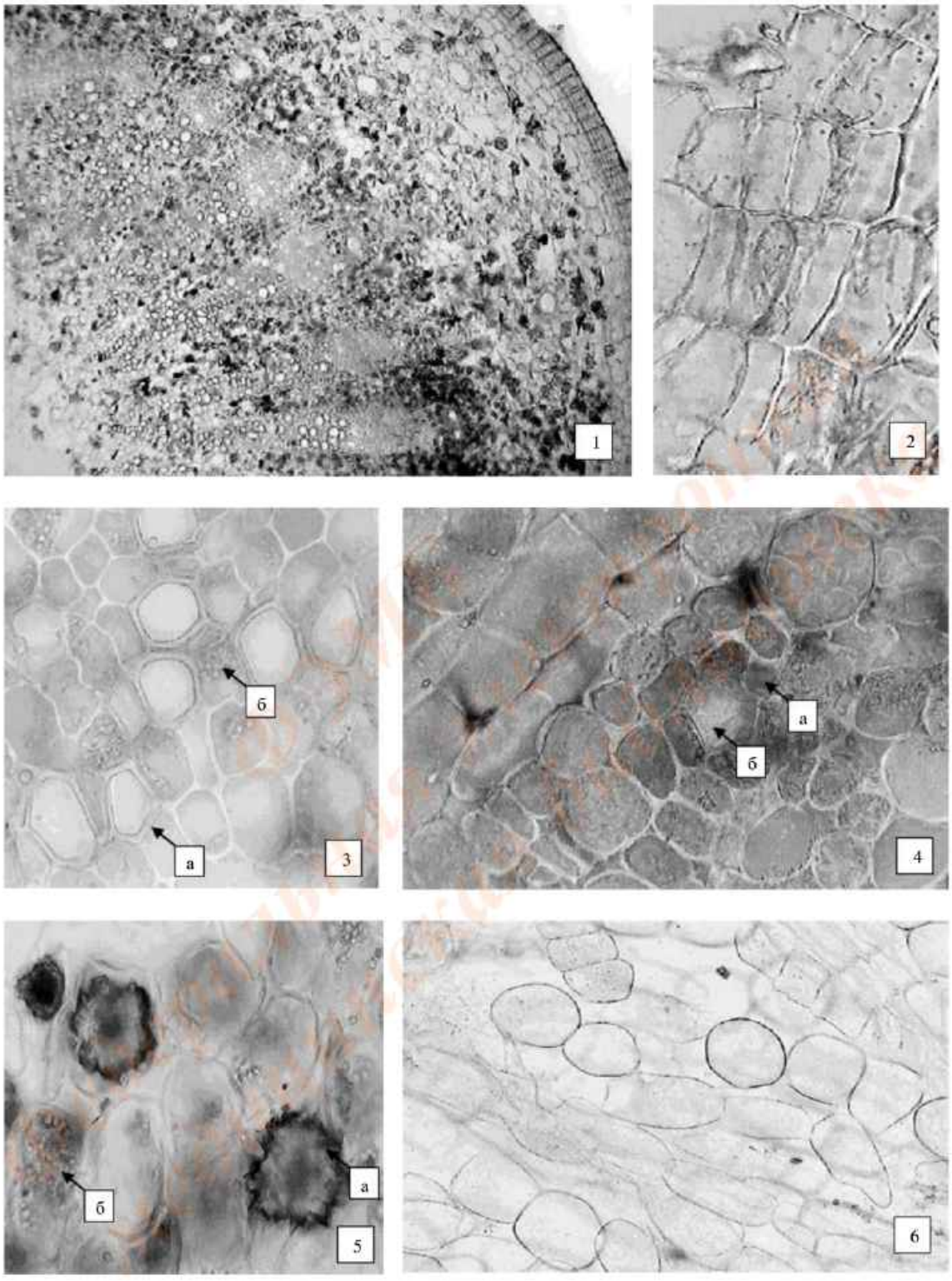


Рисунок – Женьшеня настоящего корни.
1 – фрагмент поперечного среза главного корня (100×); 2 – фрагмент пробки (400×); 3 – фрагмент поперечного среза придаточного корня: а – сосуды ксилемы, б – крахмальные зерна (400×); 4 – фрагмент поперечного среза

главного корня с секреторным каналом: а – выстилающие клетки канала, б – полость канала (400×); 5 – фрагмент паренхимы сердцевинных лучей: а – друзы оксалата кальция, б – крахмальные зерна (400×); 6 – клетки паренхимы сердцевинного луча (100×).

На поперечном срезе придаточного корня в центре луч сосудов первичной ксилемы – остаток диархного проводящего пучка при первичном строении. Два сектора вторичной ксилемы разделены радиальными лучами основной паренхимы. Клетки паренхимы округлые или овальные, частично или полностью заполнены крахмальными зернами. Пробка состоит из 5 – 7 слоев прямоугольных, тонкостенных клеток, слабо лигнифицированных.

Измельченное сырье. При рассмотрении давленного препарата должны быть видны фрагменты поперечных и продольных срезов главного и придаточных корней.

Фрагменты главного корня представлены лучами и сосудами ксилемы, заполняющими клетками паренхимы сердцевинных лучей с крахмальными зернами, полостями канала и выстилающими клетками, клетками паренхимы с пигментами, клетками камбия.

Фрагменты придаточного корня представлены клетками пробки, паренхимой с крахмальными зернами, вместилищами, первичной и вторичной корой, сосудами, сердцевинными лучами.

Порошок. При рассмотрении микропрепарата видны фрагменты эпидермиса, пробки, древесины, паренхимы, а также друзы оксалата кальция.

Определение основных групп биологически активных веществ

1. Тонкослойная хроматография

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором размером 10 × 15 см на алюминиевой подложке наносят 20 мкл испытуемого раствора (см. раздел «Количественное определение» приготовление раствора А испытуемого раствора) и 50 мкл раствора стандартного образца (СО) панаксозида Rg_1 (см.

раздел «Количественное определение» приготовление раствора А СО панаксозида Rg_1). Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщают в течение не менее 2 ч смесью растворителей хлороформ – метанол – вода (26:14:3), 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 фосфорновольфрамовой кислоты спиртовым раствором 20 % и нагревают в сушильном шкафу при 100 – 105 °С в течение 3 мин, после чего просматривают при дневном свете.

На хроматограмме испытуемого раствора должно обнаруживаться не менее 6 зон адсорбции от светло-розового до темно-розового цвета; доминирующей является зона на уровне зоны на хроматограмме раствора СО панаксозида Rg_1; допускается обнаружение других зон адсорбции.

2. При нанесении на порошок корней женьшеня капли серной кислоты концентрированной через 1 – 2 мин появляется кирпично-красное окрашивание, переходящее в красно-фиолетовое, а затем в фиолетовое (панаксозиды).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 13 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 5 %.

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 7 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не

Федеральная электронная медицинская библиотека

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

Корни, потемневшие с поверхности. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3 %.

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

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

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:* сумма панаксозидов в пересчете на панаксозид Rg_1 – не менее 2 %; экстрактивные вещества, извлекаемые 70 % спиртом, – не менее 20 %.

Сумма панаксозидов

Приготовление растворов.

Раствор серной кислоты. К 45 мл воды осторожно, при перемешивании, добавляют 60 мл серной кислоты концентрированной.

Раствор СО панаксозида Rg_1. Около 0,03 г (точная навеска) СО панаксозида Rg_1 помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в небольшом количестве спирта 96 %, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (раствор А СО панаксозида Rg_1).

Срок годности раствора 30 сут.

1,0 мл раствора А СО панаксозида Rg_1 помещают в колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл серной кислоты раствора 70 % и нагревают на водяной бане в течение 10 мин (раствор Б СО панаксозида Rg_1). Срок годности раствора 30 сут.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл спирта 70 %. Колбу закрывают пробкой и взвешивают с точностью до ± 0,01. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане (умеренное кипение) в течение 90 мин. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и при необходимости доводят до первоначальной массы спиртом 70 %. Содержимое колбы тщательно перемешивают. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр («красная полоса») (раствор А испытуемого раствора).

5,0 мл раствора А испытуемого раствора помещают в фарфоровую чашку и выпаривают на водяной бане досуха. Сухой остаток растворяют в 5 – 6 мл воды, количественно переносят на стеклянный фильтр со слоем полиамида высотой 1 – 1,5 см и элюируют 10 – 15 мл воды. Водный элюат отбрасывают. Затем слой полиамида элюируют спиртом 96 %, собирая элюат в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора).

1,0 мл раствора Б испытуемого раствора помещают в колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл серной кислоты раствора 70 % и нагревают на водяной бане в течение 10 мин (раствор В испытуемого раствора). После охлаждения измеряют оптическую плотность раствора В испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 526 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют спирт 96 %.

Параллельно определяют оптическую плотность раствора Б СО

панаксозида Rg_1 в тех же условиях.

Содержание суммы панаксозидов в пересчете на панаксозид Rg_1 в абсолютно сухом сырье в процентах (X) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 30 \cdot 10 \cdot 6 \cdot P \cdot 100}{A_0 \cdot 25 \cdot 6 \cdot a \cdot 5 \cdot 1 \cdot 100 \cdot (100 - W)} \cdot 100,$$

где A – оптическая плотность раствора В испытуемого раствора;
A_0 – оптическая плотность раствора Б СО панаксозида Rg_1;
a – навеска сырья, г;
a_0 – навеска СО панаксозида Rg_1, г;
P – содержание основного вещества в СО панаксозида Rg_1, %;
W – влажность сырья, %.

Допускается содержание суммы панаксозидов в пересчете на панаксозид Rg_1 вычислять с использованием удельного показателя поглощения продуктов гидролиза панаксозида Rg_1 с раствором серной кислоты по формуле:

$$X \frac{A \cdot 30 \cdot 10 \cdot 6 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 5 \cdot 1 \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора В испытуемого раствора;
$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения продуктов гидролиза панаксозида Rg_1 с раствором серной кислоты при 526 нм, равный 25;
a – навеска сырья, г;
W – влажность сырья, %.

Экстрактивные вещества. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье» (метод 1, экстрагент – спирт 70 %).

Примечание. Определение суммы панаксозидов в пересчете на панаксозид Rg_1 проводят для сырья, предназначенного для производства лекарственных растительных препаратов (пачки, фильтр-пакеты); определение экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 70 %, и суммы панаксозидов в пересчете на панаксозид Rg_1 – для сырья, предназначенного для производства настойки.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

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».

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Жостера слабительного плоды	**ФС.2.5.0014.15**
Rhamni catharticae fructus	**Взамен ГФ X ст. 292**
	Взамен ГФ XI ст. 37

Собранные осенью зрелые и высушенные плоды дикорастущего кустарника или небольшого дерева жостера слабительного (син.: крушина слабительная) – *Rhamnus cathartica* L., сем. крушиновых – *Rhamnaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Плоды – округлые костянки с блестящей морщинистой поверхностью, диаметром 5 – 8 мм, с небольшим малозаметным остатком столбика и с сохранившейся плодоножкой или углублением на месте ее отрыва. Мякоть коричневая с 3 – 4 (реже 2) темно-коричневыми косточками с твердой кожурой, трехгранной или яйцевидной формы. Цвет плодов от синевато-черного до почти черного, иногда с сизоватым налетом. Запах слабый, неприятный. Вкус водного извлечения сладковато-горький.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* Эпидермис состоит из мелких, толстостенных, полигональных клеток. На поверхности эпидермиса встречаются небольшие устьица, окруженные 3 рядами несколько сжатых клеток. При рассмотрении на поперечном срезе заметно, что наружная и внутренняя стенки эпидермальных клеток утолщены более боковых; колленхима представлена несколькими рядами клеток, из которых 2 наружных ряда состоят из крупных, толстостенных клеток с пигментом коричневого цвета; в паренхиме мезокарпия располагается один ряд проводящих пучков, встречаются друзы оксалата кальция и одиночные или

собранные группами идиобласты с коричневым содержимым, расположенные вдоль проводящих пучков. Эндокарпий состоит из ряда мелких кристаллоносных клеток, покрывающих толстостенные склереиды, слоя волокон.

Кожура семени плода тонкая, плотно соединенная с эндокарпием. Эпидермис ее состоит из каменистых клеток, далее видна тонкостенная паренхима, заканчивающаяся у зародыша семени рядом клеток с заметной пористостью. Эндосперм и зародыш содержат в клетках алейроновые зерна и жирное масло.

Плодоножки покрыты эпидермисом с толстым слоем кутикулы, не опушены.

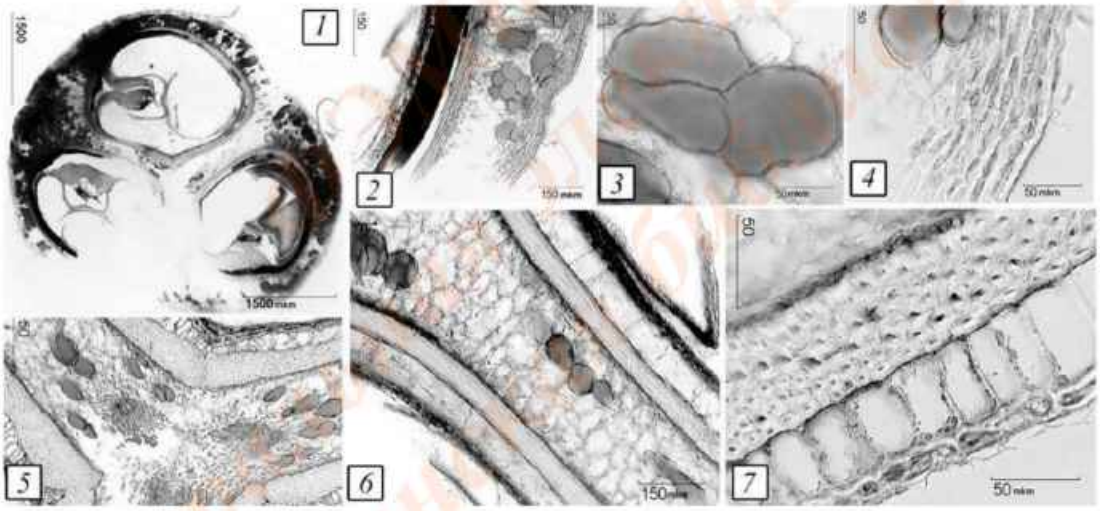


Рисунок 1 – Плод жостера слабительного. Поперечный срез.
1 – общий вид с семенными полостями (40×); 2 – паренхима перегородки (100×); 3 – клетки паренхимы с пигментом (400×); 4 – экзокарпий (400×); 5 – сердцевина плода (100×); 6 – семенная перегородка (100×); 7 – склеренхима (400×).

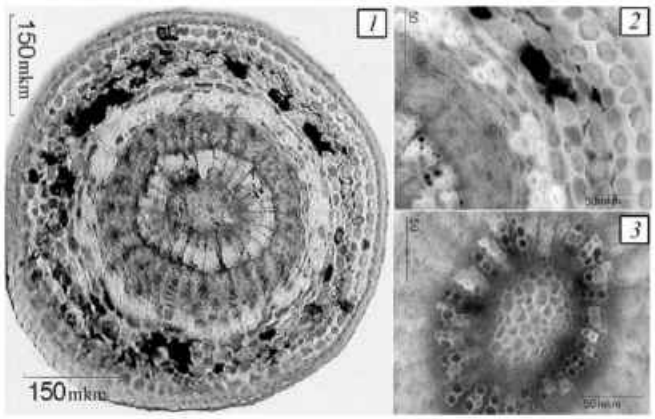


Рисунок 2 – Поперечный срез плодоножки жостера.
1 – Общий вид плодоножки (100×); 2 – фрагмент коровой части с пигментом и склеренхимой (400×); 3 – фрагмент сердцевины плодоножки.

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Раствор стандартного образца (СО) 3-О-рутинозида рамнетина. Около 0,02 г СО 3-О-рутинозида рамнетина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 30 мл спирта 70 % при нагревании на водяной бане. После охлаждения содержимого колбы до комнатной температуры доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором на алюминиевой подложке 10 × 15 см наносят 20 мкл испытуемого раствора (см. раздел «Количественное определение» приготовление раствора А испытуемого раствора), 20 мкл раствора СО 3-О-рутинозида рамнетина и 20 мкл раствора СО франгулина А (см. раздел «Количественное определение» приготовление раствора А СО франгулина А.) Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 1 ч смесью растворителей хлороформ – метанол – вода (26:14:3), 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 просматривают при дневном свете.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться зона адсорбции ярко-желтого цвета на уровне зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО 3-О-рутинозида рамнетина; зона адсорбции оранжево-красного цвета на уровне зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО франгулина А; допускается обнаружение других зон.

Затем пластинку обрабатывают диазореактивом.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции ярко-желтого цвета на уровне зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО 3-О-рутинозида рамнетина и зона адсорбции оранжево-красного цвета на уровне зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО франгулина А; допускается обнаружение других зон.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье* – не более 14 %.

Зола общая. *Цельное сырье* – не более 4 %.

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

Посторонние примеси

Недозрелые плоды. *Цельное сырье* – не более 4 %.

Подгоревшие плоды. *Цельное сырье* – не более 5 %.

Органическая примесь (посторонние плоды и веточки). *Цельное сырье* – не более 2 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье* – 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».

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

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:* сумма антраценпроизводных в пересчете на франгулин А – не менее 2,5 %,

Приготовление растворов.

Раствор СО франгулина А. Около 0,02 г (точная навеска) СО франгулина А помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 30 мл спирта 70 % при нагревании на водяной бане. После охлаждения содержимого колбы до комнатной температуры доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивают (раствор А СО франгулина А). Срок годности раствора 30 сут при хранении в хорошо укупоренной упаковке, в прохладном защищенном от света месте.

1,0 мл раствора А СО франгулина А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора щелочно-аммиачным раствором до метки и перемешивают затем раствор помещают в колбу вместимостью 100 мл, нагревают в течение 15 мин на кипящей водяной бане с обратным холодильником и охлаждают до комнатной температуры. (раствор Б СО франгулина А). Срок годности раствора 3 мес при хранении в хорошо укупоренной упаковке, в прохладном защищенном от света месте.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл спирта 40 %. Колбу закрывают пробкой и взвешивают с точностью до ± 0,01 г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 60 мин. После охлаждения колбу закрывают той же пробкой, снова взвешивают, восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр (раствор А испытуемого раствора).

1,0 мл раствора А испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора щелочно-аммиачным

раствором до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора). Раствор Б испытуемого раствора переносят в колбу вместимостью 50 мл, нагревают в течение 15 мин на кипящей водяной бане с обратным холодильником, а затем охлаждают до комнатной температуры.

Оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора измеряют на спектрофотометре при длине волны 524 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл раствора А испытуемого раствора доведенный щелочно-аммиачным раствором до метки в мерной колбе вместимостью 50 мл перемешивают и обрабатывают аналогично раствору Б испытуемого раствора.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО франгулина А на спектрофотометре при длине волны 524 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл спирта 70 % доведенный щелочно-аммиачным раствором до метки в мерной колбе вместимостью 50 мл, перемешивают и обрабатывают аналогично раствору Б СО франгулина А.

Содержание суммы антраценпроизводных в пересчете на франгулин А в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X \frac{A \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 50 \cdot 50 \cdot P \cdot 100}{A_0 \cdot 50 \cdot 25 \cdot a \cdot 1 \cdot 100 \cdot (100 - W)} \cdot 100,$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
A_o – оптическая плотность раствора Б СО франгулина А;
a – навеска сырья, г;
a_o – навеска СО франгулина А, г;
P – содержание франгулина А в СО, %;
W – влажность сырья, %.

Допускается содержание суммы антраценпроизводных в пересчете на франгулин А вычислять с использованием удельного показателя поглощения франгулина А со щелочно-аммиачным раствором по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 50 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;

$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения франгулина А со щелочно-аммиачным раствором при длине волны 524 нм, равный 180;

a – навеска сырья, г;

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».

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Зверобоя трава	**ФС.2.5.0015.15**
Hyperici herba	**Взамен ГФ X ст. 324**
	Взамен ГФ XI ст. 52
	(изм. № 4 от 25.12.1999)

Собранная в фазу цветения и высушенная трава дикорастущего и культивируемого многолетнего растения зверобоя продырявленного, *Hypericum perforatum* L., и зверобоя пятнистого (зверобоя четырехгранного), *Hypericum maculatum Crantz* (*H. quadrangulum* L.), сем. зверобойных – *Hypericaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Верхние части стеблей с листьями, цветками, бутонами и недозрелыми плодами. Стебли полые, цилиндрические, длиной до 50 см, с 2 (у зверобоя продырявленного) или 4 (у зверобоя пятнистого) продольными ребрами. Листья супротивные, сидячие, продолговатые или продолговато-овальные, цельнокрайние, голые, до 3,5 см, шириной до 1,4 см. У зверобоя продырявленного листья с многочисленными просвечивающимися вместилищами в виде светлых точек. Цветки многочисленные, около 1 – 1,5 см в диаметре, собраны в щитковидную метелку. Чашечка сростнолистная, глубокопятираздельная, чашелистики ланцетовидные, тонко заостренные (у зверобоя продырявленного) или продолговато-овальные (у зверобоя пятнистого). Венчик раздельнолепестной, в 2 – 3 раза длиннее чашечки, лепестков 5. Тычинки многочисленные, сросшиеся у основания нитями в 3 пучка. Плод –

трехгнездная многосемянная коробочка.

Цвет стеблей – от зеленовато-желтого до серовато-зеленого, иногда розовато-фиолетовый; листьев – от серовато-зеленого до темно-зеленого; лепестков – ярко-желтый или желтый с темными точками, хорошо заметными под лупой; плодов – зеленовато-коричневый. Запах слабый, своеобразный. Вкус водного извлечения горьковатый, слегка вяжущий.

Измельченное сырье. Различной формы кусочки стеблей, листьев, цветков, недозрелые плоды и их части, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.

При рассмотрении измельченного сырья 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 измельченного сырья от серовато- или желтовато-зеленого до темно-зеленого, с зеленовато-желтыми, желтыми, зеленовато-коричневыми, редко – розовато-фиолетовыми и коричневыми вкраплениями. Запах слабый, своеобразный. Вкус водного извлечения горьковатый, слегка вяжущий.

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 порошка от серовато-зеленого до темно-зеленого и зеленовато-коричневого с многочисленными белыми, желтовато-белыми, желтыми и коричневыми вкраплениями. Запах слабый, своеобразный. Вкус водного извлечения горьковатый, слегка вяжущий.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье, измельченное сырье.* 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 сырья, в том числе фрагменты листовых пластинок в поперечном сечении.

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

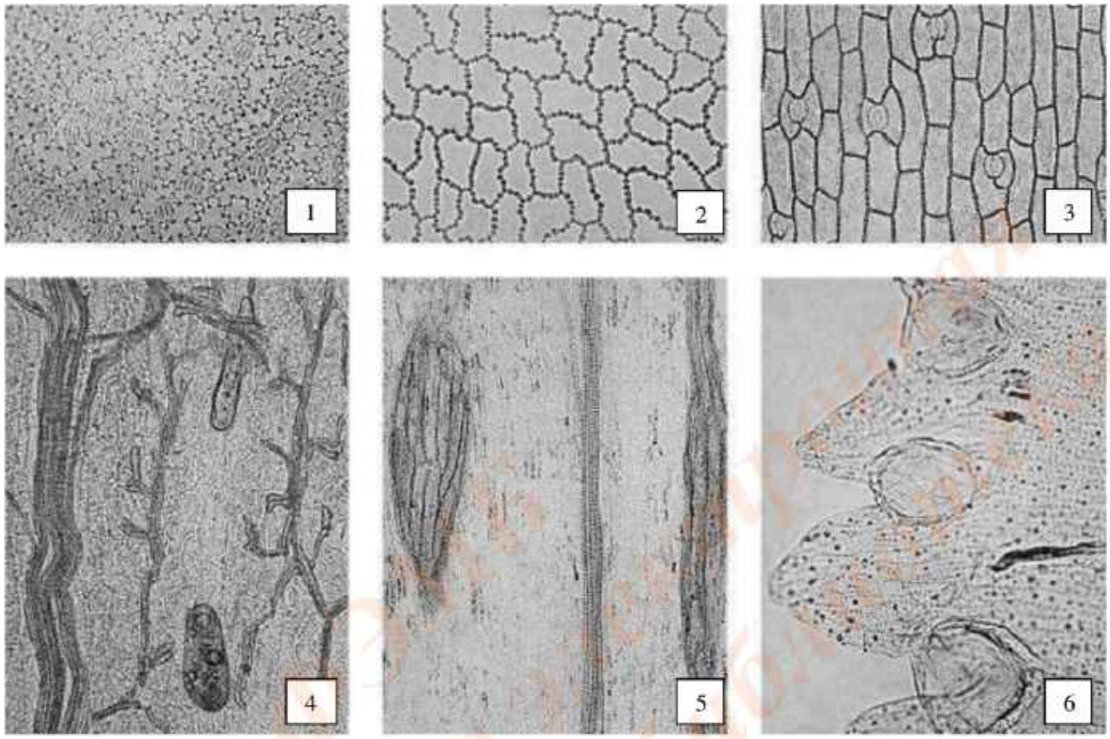


Рисунок – Зверобоя трава.
1 – фрагмент эпидермиса листа (нижняя сторона): четковидные утолщения стенок клеток и устьица анизоцитного типа (200×), 2 – фрагмент эпидермиса листа (верхняя сторона) с четковидным утолщением стенок клеток (200×), 3 – фрагмент эпидермиса стебля: четковидные утолщения стенок 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 для детектирования 1. 1 г дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира растворяют в 100 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор для детектирования 2. 5 мл полиэтиленгликоля (ПЭГ) 400 смешивают со 100 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 6 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

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 измельченного сырья 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 кипящей водяной бане до кипения. После охлаждения извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля на полимерной подложке размером 10 × 10 см наносят 10 мкл испытуемого раствора и рядом 5 мкл раствора СО рутина. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 60 мин 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 раствором для детектирования 1 и раствором для детектирования 2, выдерживают в сушильном шкафу при температуре 105 °С 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 2 зоны адсорбции с флуоресценцией оранжевого или желтого цвета на уровне зоны на хроматограмме раствора СО рутина и выше зоны рутина, 2 зоны адсорбции с флуоресценцией желтого или зеленовато-желтого цвета выше зоны рутина, зона адсорбции с флуоресценцией голубого цвета выше зоны рутина; допускается обнаружение других зон адсорбции.

2. Около 1,0 г измельченного сырья кипятят в течение 2 – 3 мин с 20 мл воды, охлаждают и фильтруют через бумажный фильтр. К 2 мл фильтрата прибавляют 2 мл железа(III) аммония сульфата раствора 10 %; должно наблюдаться черно-зеленое окрашивание (дубильные вещества).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 13 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 8 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 1 %.

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 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 %.

Посторонние примеси

Сырье, изменившее окраску (потемневшее и почерневшее). *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3 %.

Стебли (в том числе отделенные при анализе). *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 50 %.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

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

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

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

Приготовление растворов.

Раствор СО рутина. Около 0,05 г (точная навеска) СО рутина, предварительно высушенного при температуре 130 – 135 °С в течение 3 ч, растворяют в 85 мл спирта 96 % в мерной колбе вместимостью 100 мл при нагревании на водяной бане, охлаждают, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, 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 спиртового раствора 2 %, доведенного спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл, перемешивают. (раствор Б СО рутина).

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл спирта 50 %. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин,

периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Горячее извлечение фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл так, чтобы частицы сырья 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 (раствор А испытуемого раствора).

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

Оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора измеряют через 40 мин на спектрофотометре при длине волны 415 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл раствора А испытуемого раствора 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 таких 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 сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 100 \cdot 1 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot 100 \cdot 25 \cdot 1 \cdot (100 - W) \cdot 100},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
A_o – оптическая плотность раствора Б СО рутина;
a – навеска сырья, г;
a_o – навеска СО рутина, г;
P – содержание основного вещества в СО рутина, %;
W – влажность сырья, %.

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

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлорида при длине волны 415 нм, равный 248;

a – навеска сырья, г;

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».

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Земляники лесной листья **ФС.2.5.0016.15**

Fragariae vescae folia **Взамен ФС 42-0144-05**

Собранные в фазу цветения, высушенные листья дикорастущего многолетнего травянистого растения земляники лесной – *Fragaria vesca* L., сем. розоцветных – *Rosaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Листья сложные цельные или частично измельченные, тройчатые, с остатком черешка длиной до 1 см. Отдельные листочки сложного листа длиной от 1,5 до 6 см, шириной от 1,6 до 4 см. Средний листочек на коротком черешке, яйцевидной или ромбической формы, боковые листочки округлоромбические с крупными, треугольными или почти округлыми зубцами с каждой стороны, конечный зубец листочка несколько уже соседних зубцов и не выдается над ними. Жилкование перистое. Жилки, средняя и первого порядка, сильно выступающие с нижней стороны листочков. Цвет сверху зеленый или темно-зеленый, снизу серовато-зеленый.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) на листочках заметны сероватые волоски (редкие на верхней стороне и более многочисленные на нижней поверхности). Волоски прямые или изогнутые у основания, направленные к верхушке листа. С нижней стороны листа выступают жилки желтоватого цвета. Черешок густо покрыт сероватыми волосками. Запах слабый. Вкус водного извлечения горьковатый, слегка вяжущий.

Измельченное сырье. Кусочки листьев различной формы и черешков, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки листьев зеленого или серовато-зеленого цвета и фрагменты черешка серовато-зеленого цвета. На фрагментах листовых пластинок заметны сероватые волоски (редкие на верхней стороне и более многочисленные на нижней поверхности) и выступающие с одной стороны листа желтоватые жилки. Фрагменты черешка густо покрыты сероватыми волосками.

Цвет зеленый или серовато-зеленый. Запах слабый. Вкус водного извлечения горьковатый, слегка вяжущий.

Порошок. Кусочки листьев и черешков, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны фрагменты листьев зеленого или серовато-зеленого цвета и фрагменты черешка серовато-зеленого цвета. На фрагментах листовых пластинок заметны сероватые волоски (редкие на верхней стороне и более многочисленные на нижней поверхности) и выступающие с одной стороны листа желтоватые жилки. Фрагменты черешка густо покрыты сероватыми волосками.

Цвет зеленый или серовато-зеленый. Запах слабый. Вкус водного извлечения горьковатый, слегка вяжущий.

Микроскопические признаки. *Цельное, измельченное сырье.* При рассмотрении микропрепаратов листа с поверхности должны быть видны клетки верхнего эпидермиса 5–7-угольные, со слабо извилистыми боковыми стенками, местами имеют четко видные утолщения; клетки нижнего эпидермиса более извилистостенные. Устьица округлые, погруженные, окружены 4 – 6 околоустьичными клетками (аномоцитный тип), расположены, в основном, на нижнем эпидермисе. Замыкающие клетки устьиц имеют почковидную форму. Встречаются волоски простые и

Федеральная электронная медицинская библиотека ЭЭМБ

головчатые. Простые волоски многочисленные, особенно на нижней стороне листа, прямые или изогнутые у основания, направленные к верхушке листа, одноклеточные, толстостенные, с ровной или слегка волнистой поверхностью. Полость волоска расширенная у основания, суживается в кончике до нитевидной.

Головчатые волоски встречаются преимущественно на нижней стороне листа, на верхней – редко, тонкостенные, имеют 2–3-клеточную ножку и 1-клеточную головку. Головка продолговатоовальная или шарообразная, иногда со светло-коричневым содержимым. В местах прикрепления волосков клетки эпидермиса образуют розетку. В паренхиме листа, особенно вдоль жилок, содержатся включения оксалата кальция преимущественно в виде друз, реже – в виде ромбических кристаллов.

Клетки эпидермиса черешка прозенхимной формы, 5–7-угольные, с прямыми стенками, вытянуты вдоль черешка. Волоски эпидермиса черешка простые и головчатые, имеют строение, аналогичное волоскам листа. В паренхиме черешка, особенно вдоль жилок, встречаются друзы оксалата кальция.

Порошок. При рассмотрении микропрепаратов порошка должны быть видны фрагменты эпидермиса с извилистыми клетками верхнего эпидермиса и нижнего эпидермиса, местами имеющими четко видные утолщения; устьица аномоцитного типа, округлые, погруженные, окружены 4 – 6 околоустьичными клетками (аномоцитный тип), расположены, в основном, на нижнем эпидермисе. Замыкающие клетки устьиц имеют почковидную форму. Волоски простые – многочисленные прямые или изогнутые у основания, одноклеточные, толстостенные, с ровной или слегка волнистой поверхностью, с расширенной у основания полостью, суживающейся в кончике до нитевидной; фрагменты паренхимы листа с жилками и включениями оксалата кальция преимущественно в виде друз, реже - в виде ромбических кристаллов.

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

Встречаются фрагменты клеток эпидермиса черешка прозенхимной формы, 5–7-угольные, с прямыми стенками; с простыми одноклеточными, толстостенными волосками с ровной поверхностью, заостренными на верхушке и друзами оксалата кальция.

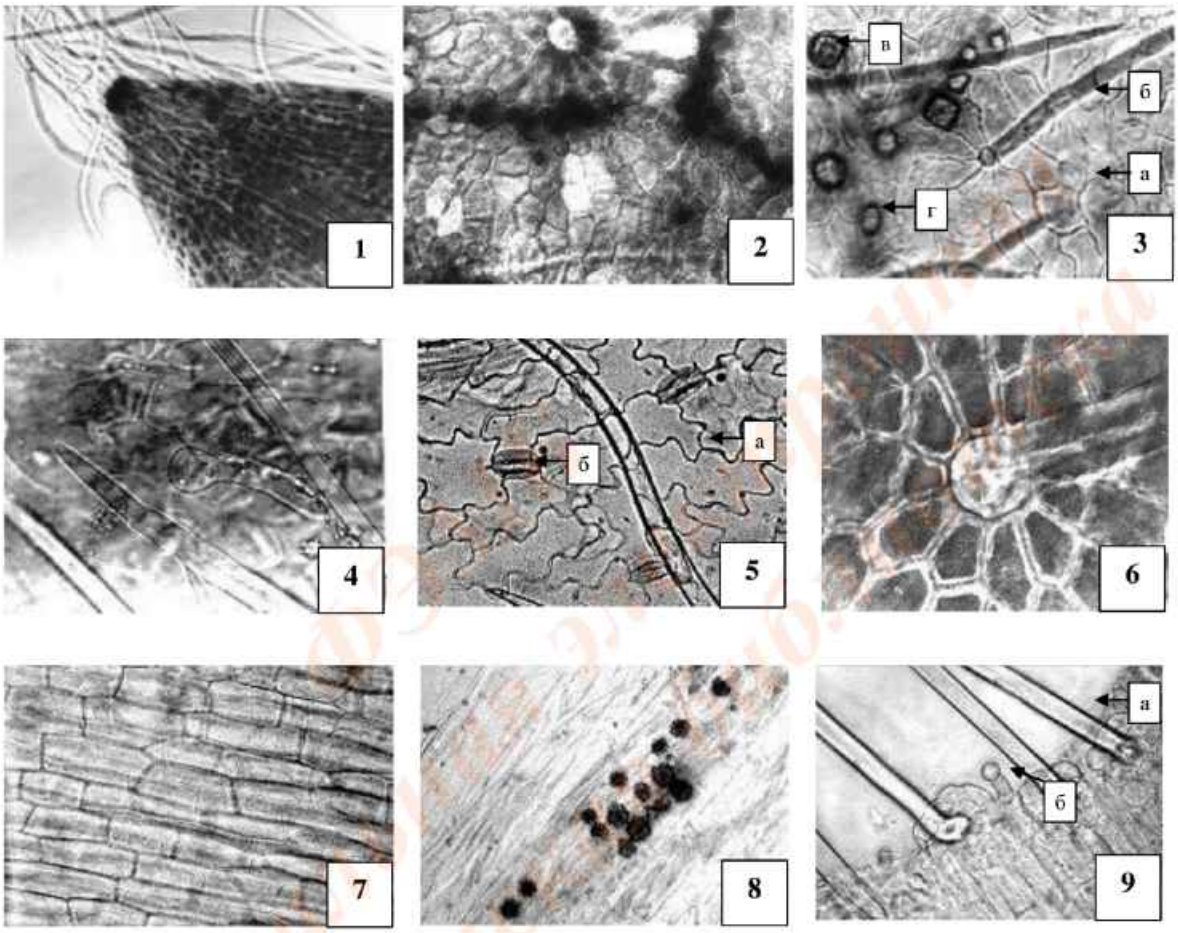


Рисунок – Земляники лесной листья.
1 – фрагмент эпидермиса листа с простыми волосками, направленными к верхушке (90×); 2 – клетки верхнего эпидермиса со слабоизвилистыми стенками (140× 140); 3 – клетки нижнего эпидермиса с извилистыми стенками (а), простые волоски (б), друзы (в) и ромбические кристаллы (г) оксалата кальция (280×); 4 – фрагмент нижнего эпидермиса листа с головчатым (а) и простыми (б) волосками (280×); 5 – фрагмент нижнего эпидермиса листа с извилистыми стенками (а) и устьицами аномоцитного типа (б) (300×); 6 – розетка эпидермальных клеток вокруг основания простого волоска (280×); 7 – фрагмент клеток эпидермиса черешка с прямыми стенками (300×); 8 – фрагмент эпидермиса черешка с друзами (140×); 9 – фрагмент эпидермиса черешка с простыми (а) и головчатыми (б) волосками (140×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором на алюминиевой подложке размером 10 × 15 см наносят 70 мкл испытуемого раствора (см. раздел «Количественное определение. Сумма флавоноидов» приготовление раствора А испытуемого раствора) в виде полосы длиной 10 мм и шириной не более 2 мм и рядом 5 мкл раствора стандартного образца (СО) рутина (см. раздел «Количественное определение. Сумма флавоноидов» приготовление раствора А СО рутина). Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру со смесью растворителей: этилацетат – муравьиная кислота безводная – вода (70:15:15) 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 (в вытяжном шкафу) и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции темного цвета на уровне зоны на хроматограмме раствора СО рутина, одна зона темного цвета – ниже и 2 зоны темного цвета – выше зоны на хроматограмме раствора СО рутина.

Затем пластинку обрабатывают алюминия хлорида спиртовым раствором 5 %, нагревают при температуре 100 – 105 °С в сушильном шкафу в течение 2 – 3 мин, после чего просматривают при дневном свете.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться зоны желтого цвета, в УФ-свете при длине волны 365 нм зоны с флуоресценцией желтого цвета.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 13 %.

Федеральная электронная медицинская библиотека

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

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 3 %.

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 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 %.

Посторонние примеси

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

Другие части земляники. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 5 %.

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:* сумма флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 1 %; экстрактивных веществ, извлекаемых водой, – не менее 25 %.

Сумма флавоноидов.

Приготовление растворов.

Раствор СО рутина. Около 0,05 г (точная навеска) СО рутина, предварительно высушенного при температуре 130 – 135 °С в течение 3 часов, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 85 мл спирта 70 % и нагревают на водяной бане до полного растворения. Затем охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора до метки тем же спиртом и перемешивают (раствор А СО рутина).

1,0 мл раствора А СО рутина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл алюминия хлорида раствора 5 % в спирте 70 % и через 10 мин 1 мл раствора кислоты уксусной 3 %, объем раствора доводят тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор Б СО рутина).

Срок годности растворов 30 сут при хранении в хорошо укупоренной упаковке, в прохладном, защищенном от света месте.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл спирта 70 % и взвешивают с погрешностью ± 0,01 г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на водяной бане в течение 1,5 ч, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и при необходимости доводят до первоначальной массы спиртом 70 %. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр, смоченный тем же спиртом, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А испытуемого раствора).

2,0 мл раствора А испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл алюминия хлорида раствора 5 % в спирте 70 % и через 10 мин 1 мл уксусной кислоты раствора 3 %, объем раствора доводят тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора).

Оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора измеряют через 30 мин на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2 мл раствора А испытуемого раствор, 1 мл уксусной кислоты раствора 3 %, доведенный спиртом 70 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измерят оптическую плотность раствора Б СО рутина в таких же условиях. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл раствора А СО рутина, 1 мл уксусной кислоты раствора 3 %, доведенный спиртом 70 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot a_0 \cdot 1 \cdot P \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 2 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100 \cdot (100 - W)} \cdot 100,$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
A_0 – оптическая плотность раствора Б СО рутина;
a – навеска сырья, г;
a_0 навеска СО рутина, г;
P – содержание основного вещества в СО рутина, %;
W – влажность сырья, %.

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

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 2 \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при длине волны 410 нм, равный 260;
a – навеска сырья, г;
W – влажность сырья, %.

Экстрактивные вещества. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1, экстрагент - вода).

Примечание. Определение суммы флавоноидов в пересчете на рутин и экстрактивных веществ, извлекаемых водой, проводят для сырья, предназначенного для производства лекарственных растительных препаратов (пачки, фильтр-пакеты).

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».

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Калины обыкновенной кора	**ФС.2.5.0017.15**
Viburni opuli cortex	**Взамен ГФ X ст. 185**
	Взамен ГФ XI ст. 4

Собранная весной в фазу бутонизации кора стволов и ветвей дикорастущего и культивируемого кустарника или небольшого дерева калины обыкновенной – *Viburnum opulus* L., сем. жимолостных – *Caprifoliaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Трубчатые, желобоватые или плоские кусочки коры различной длины, толщиной около 2 мм. Наружная поверхность коры морщинистая, коричневато-серая или зеленовато-серая с мелкими чечевичками. Внутренняя поверхность гладкая, светло- или коричневато-желтая с мелкими красноватыми пятнышками или полосками. Излом коры мелкозернистый. Запаха нет или запах слабый неспецифический. Вкус водного извлечения горьковатый, вяжущий.

Измельченное сырье. При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки коры различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Кусочки коры, снаружи морщинистые коричневато-серого или зеленовато-серого цвета, с мелкими чечевичками; с внутренней стороны кусочки гладкие, светло- или коричневато-желтого цвета с мелкими красноватыми пятнышками или полосками. Излом – мелкозернистый. Запаха нет или запах слабый неспецифический. Вкус водного извлечения горьковатый вяжущий.

Порошок. При рассмотрении порошка под лупой (10×) или

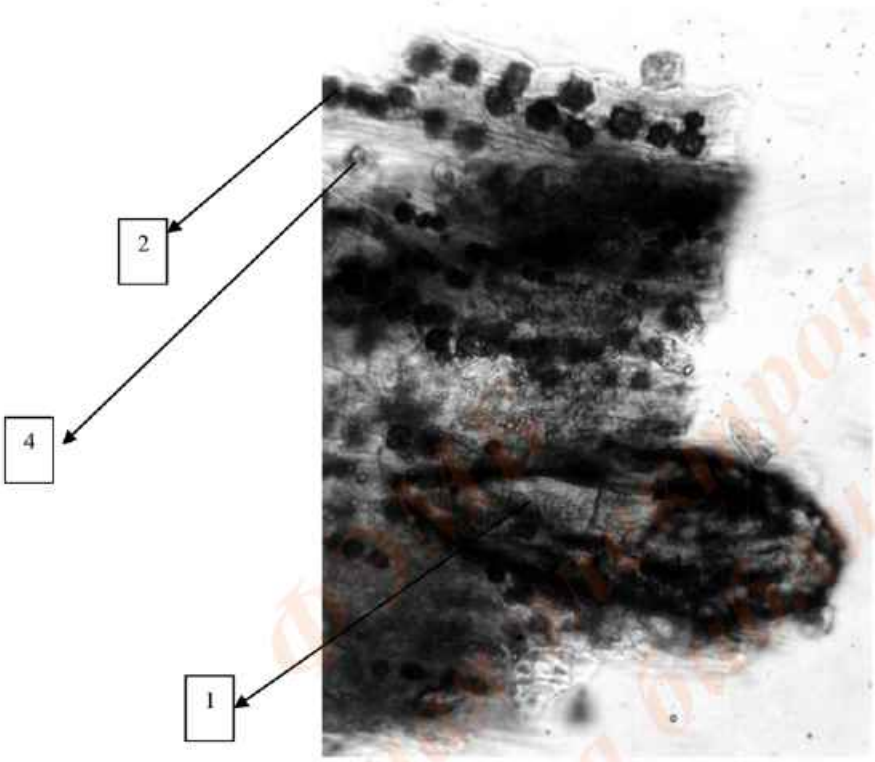
стереомикроскопом (16×) видна смесь частиц коры коричневато-серого, зеленовато-серого или коричневато-желтого цвета, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Запаха нет или запах слабый неспецифический. Вкус водного извлечения горьковатый, вяжущий.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* На поперечном срезе должен быть виден коричневый многорядный пробковый слой (более 100 рядов) с клетками неправильной формы (округлой, прямоугольной, квадратной в очертании) с прямыми и слабоизвилистыми стенками. Под пробкой располагается 3 – 4 ряда пластинчатой колленхимы. На границе первичной и вторичной коры одиночно или небольшими группами (по 2 – 4) расположены лубяные волокна. Стенки лубяных волокон толстые, слоистые, неодревесневшие, пронизаны тончайшими порами. Во вторичной коре редко расположены одно-трехрядные сердцевинные лучи; встречаются крупные каменистые клетки желтого цвета с сильно утолщенными слоистыми стенками, пронизанными многочисленными порами. Каменистые клетки представлены небольшими (2 – 6) тангентально-вытянутыми группами, реже встречаются одиночно. В паренхиме коры, особенно первичной, видны многочисленные крупные и мелкие друзы оксалата кальция и капли смолы.

Измельченное сырье. При рассмотрении давленого препарата должны быть видны мелкие и крупные частицы (обычно в продольном сечении): фрагменты бурой пробковой ткани; группы лубяных волокон с толстыми, слоистыми, неодревесневшими, пронизанными тончайшими порами стенками среди паренхимных клеток; фрагменты паренхимы с клетками, содержащими друзы оксалата кальция и капельки смолы; фрагменты паренхимы с каменистыми клетками желтого цвета с сильно утолщенными слоистыми стенками; отдельные группы каменистых клеток; одиночные друзы оксалата кальция.

Порошок. При рассмотрении микропрепарата порошка должны быть видны: фрагменты пробки; группы лубяных волокон с толстыми, слоистыми, неодревесневшими, пронизанными тончайшими порами, стенками;

фрагменты паренхимы с клетками, содержащими друзы оксалата кальция и капельки смолы; группы каменистых клеток и отдельные каменистые клетки; одиночные друзы оксалата кальция.



Федеральная электронная медицинская библиотека

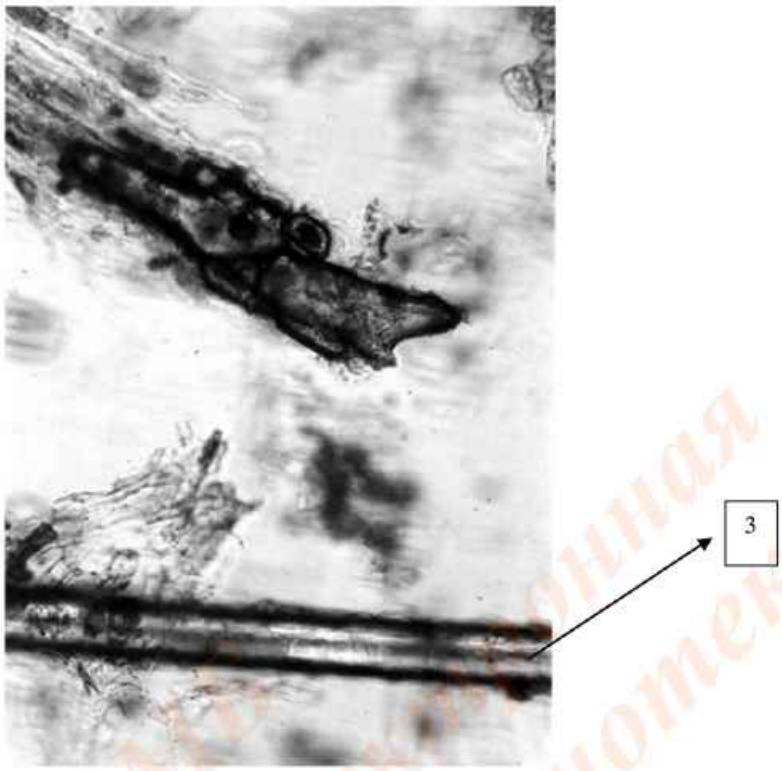


Рисунок – Калины обыкновенной кора:
слева – давленый препарат (125×); справа порошок (100×). 1 – группы каменистых клеток; 2 – друзы оксалата кальция; 3 – лубяное волокно; 4 – капли смолы.

Определение основных групп биологически активных веществ

1. ***Тонкослойная хроматография***

Около 0,5 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, заливают 10 мл спирта 96 % и настаивают в течение 20 мин при комнатной температуре. Полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр в круглодонную колбу и выпаривают под вакуумом до объема около 1 – 1,5 мл (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля на алюминиевой подложке размером 10 × 15 см наносят 100 мкл испытуемого раствора.

Пластинку с нанесенной пробой сушат на воздухе, помещают в камеру со смесью растворителей хлороформ – метанол (9:1) 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 в вытяжном шкафу. Пластинку обрабатывают реактивом Шталя и выдерживают в сушильном шкафу при температуре 110 °С в течение 5 – 8 мин.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться 3 – 5 зон адсорбции сине-зеленого цвета и 2 – 3 зоны адсорбции красно-малинового цвета.

2. При смачивании внутренней поверхности коры каплей железа(III) аммония сульфата раствора должно наблюдаться черно-зеленое окрашивание (дубильные вещества).

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 1 %.

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 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 %.

Посторонние примеси

Кусочки коры, потемневшие с внутренней стороны. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 5 %.

Кусочки коры с остатками древесины и веточек. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 2 %.

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

1,5 %.

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:* дубильных веществ в пересчете на танин – не менее 4 %; экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 50 %, – не менее 18 %.

Дубильные вещества. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1).

Экстрактивные вещества. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1, экстрагент – спирт 50 %).

Примечание. Определение дубильных веществ в пересчете на танин проводят для сырья, предназначенного для производства лекарственных растительных препаратов (пачки, фильтр-пакеты); экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 50 %, для сырья, предназначенного для производства экстрактов.

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».

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Кориандра посевного плоды	**ФС.2.5.0018.15**
Coriandri sativi fructus	**Взамен ГФ IX, ст. 214**

Собранные зрелые и высушенные плоды культивируемого однолетнего травянистого растения кориандра посевного – *Coriandrum sativum* L., сем. сельдерейных – *Apiaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Плоды (вислоплодники) размером 1,5 – 6 мм шарообразной формы, отдельные полуплодики, от желтовато-серого до коричневато-серого или от соломенно-желтого до желтовато-коричневого цвета. На поверхности околоплодника цельного плода видны 10 продольных извилистых ребрышек, чередующихся с 12 прямыми, на верхушке плода – остатки чашечки и столбика. На внутренней стороне каждого полуплодика видны два крупных удлиненно-овальных эфирномасличных канала желтовато-коричневого или коричневого цвета. Запах сильный, специфический, ароматный. Вкус водного извлечения пряный.

Порошок. При рассмотрении порошка под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны полусферические мерикарпии (полуплодики) без перикарпия (околоплодника) и их кусочки, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, от желтовато-серого до желтовато-коричневого или серовато-коричневого цвета, иногда с сохранившимся слоем эндокарпия, имеющим слегка шероховатую поверхность; на внутренней стороне полуплодиков видны цельные или частично сохранившиеся два удлиненно-овальных эфирномасличных канала; кусочки

перикарпия вогнутые, тонкие, светло-желтые с внутренней стороны и светло-коричневые с выпуклой наружной стороны с заметными извилистыми и прямыми ребрышками; кусочки семени от светло-коричневого до темно-коричневого цвета. Запах сильный, специфический, ароматный. Вкус водного извлечения пряный.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* На поперечном срезе плода должны быть видны: эпидермис околоплодника (экзокарпий), состоящий из двух слоев овальных клеток; тангентально вытянутые клетки мезокарпия; механический пояс, состоящий из волокнистых склереид с сильноутолщенными лигнифицированными оболочками, расположенных пластами, которые видны как в поперечном, так и в продольном сечении; примыкающие к механическому поясу тангентально вытянутые клетки с сетчатым и пористым утолщением; эндокарпий околоплодника, плотно сросшийся с семенной кожурой, заметен в виде темной полосы; семя, имеющее форму полумесяца; на плоской стороне мерикарпиев – крупные эфирномасличные канальцы, по два у каждого полуплодика; эндосперм семени, состоящий из крупных многоугольных толстостенных клеток, заполненных алейроновыми зернами, каплями жирного масла и мелкими друзами оксалата кальция.

При рассмотрении под микроскопом давленого препарата плода должны быть видны фрагменты эпидермиса экзокарпия с устьицами; фрагменты механического слоя мезокарпия, волнистые толстостенные волокна которого расположены в продольном и поперечном направлениях; фрагменты эндокарпия, группы узких длинных тонкостенных клеток которого расположены в косо-продольном и продольном направлениях, часто с остатками паренхимы мезокарпия, представленной толстостенными пористыми клетками; фрагменты семени, включающие тонкостенные коричневатые клетки семенной кожуры и группы крупных многоугольных толстостенных клеток эндосперма, заполненных алейроновыми зернами, каплями жирного масла и мелкими друзами оксалата кальция; цельный

зародыш с округлыми листочками или его фрагменты.

Порошок. При рассмотрении под микроскопом должны быть видны фрагменты эпидермиса экзокарпия с устьицами; фрагменты механического слоя мезокарпия, волнистые толстостенные волокна которого расположены в продольном и поперечном направлениях; фрагменты эндокарпия, группы узких длинных тонкостенных клеток которого расположены в косо-продольном и продольном направлениях, часто с остатками паренхимы мезокарпия, представленной толстостенными пористыми клетками; фрагменты семени, включающие тонкостенные коричневатые клетки семенной кожуры и группы крупных многоугольных толстостенных клеток эндосперма, заполненных алейроновыми зернами, каплями жирного масла и мелкими друзами оксалата кальция; цельный зародыш с округлыми листочками или его фрагменты.

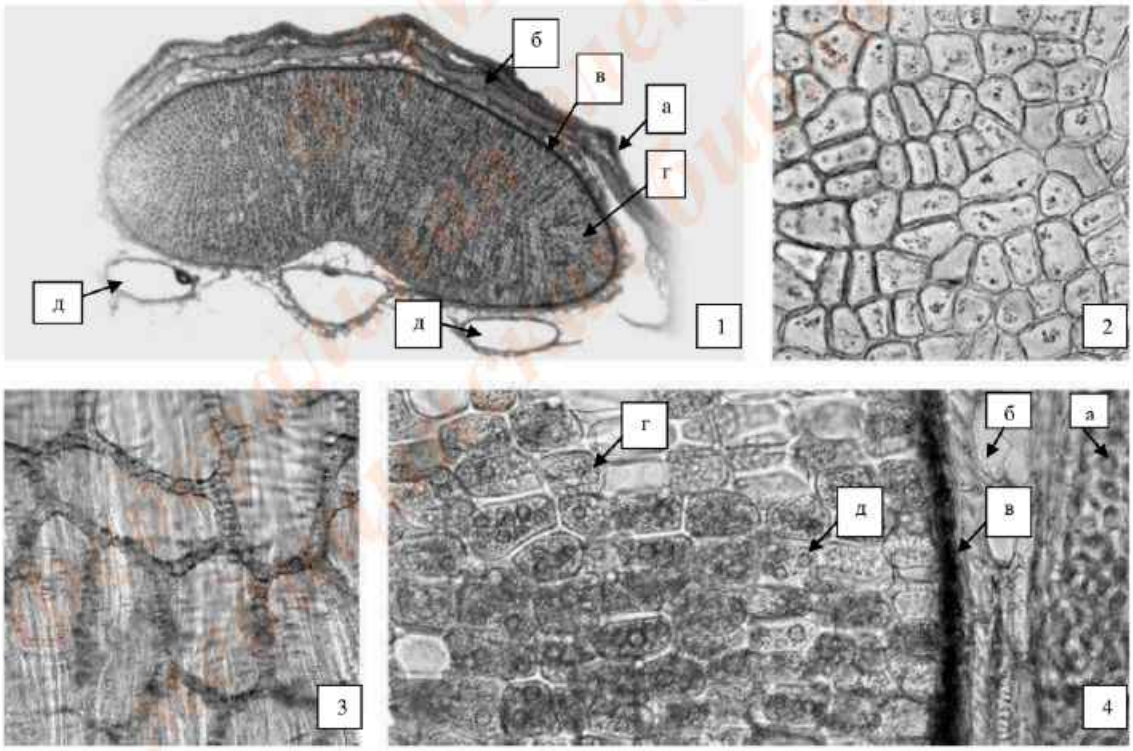


Рисунок – Кориандра плоды.
1 – поперечный срез полуплодика: а – экзокарпий, б – механический слой мезокарпия, в – эндокарпий, г – эндосперм семени, д – эфирномасличные канальцы (40×); 2 – клетки эпидермиса (200×); 3 – фрагмент эндокарпия (200×); 4 – фрагмент поперечного среза полуплодика: а – механический слой

мезокарпия, б – тангентально вытянутые клетки с сетчатым и пористым утолщением, в – эндокарпий, г – эндосперм семени с каплями масла, д – эндосперм семени с друзами оксалата кальция (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) судана III. Около 0,002 г СО судана III растворяют в 10 мл толуола и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор для детектирования. Смешивают последовательно 0,5 мл анисового альдегида, 10 мл уксусной кислоты ледяной, 85 мл спирта 96 % и 5 мл серной кислоты концентрированной и перемешивают. Срок годности раствора не более 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около 1,0 г сырья, измельчают до отсутствия цельных плодов и сразу помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл смеси толуол – спирт 96 % (1:4) и выдерживают на ультразвуковой бане в течение 10 мин. Полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр, содержащий 2 г натрия сульфата безводного (испытуемый раствор).

На линию старта высокоэффективной хроматографической пластинки со слоем силикагеля на полимерной подложке размером 10×10 см наносят 10 мкл испытуемого раствора и 5 мкл раствора СО судана III.

Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин смесью растворителей толуол – этилацетат (95:5) 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 просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО судана III должна обнаруживаться зона адсорбции розовато-красного цвета.

Пластинку обрабатывают раствором для детектирования, выдерживают

в сушильном шкафу при 100 – 105 °С в течение 2 – 3 мин и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО судана III должна обнаруживаться зона адсорбции фиолетового, красно-фиолетового, фиолетово-голубого или голубого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться зона адсорбции фиолетового или фиолетово-коричневого цвета ниже зоны на хроматограмме раствора СО судана III и зона адсорбции фиолетового или серо-фиолетового цвета выше зоны судана III; допускается обнаружение дополнительных зон.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье*, *порошок* – не более 13 %.

Зола общая. *Цельное сырье*, *порошок* – не более 7 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье*, *порошок* – не более 1,5 %.

Измельченность сырья. *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

Поврежденные, недоразвитые плоды кориандра и другие части растения. *Цельное сырье* – не более 3 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье* – не более 2 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье*, *порошок* – не более 1 %.

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

Фармакопейная электронная библиотека ФЭМБ

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*: эфирного масла – не менее 0,5 %. *Порошок:* эфирного масла – не менее 0,3 %.

Определение эфирного масла проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 2, из 20,0 г сырья, измельченного до отсутствия цельных плодов, время перегонки 1 ч).

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».

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Крапивы двудомной листья	**ФС.2.5.0019.15**
Urticae dioicae folia	**Взамен ГФ XI ст. 25**
	(изм. № 1 от 14.11.1996)

Собранные во время бутонизации и цветения, высушенные листья дикорастущего и культивируемого многолетнего травянистого растения крапивы двудомной – *Urtica dioica* L., сем. крапивных – *Urticaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Листья цельные или частично измельченные, простые, черешковые, длиной до 20 см, шириной до 9 см, яйцевидно-ланцетовидные и широкояйцевидные с острой верхушкой и сердцевидным основанием; край остро- и крупнопильчатый с изогнутыми к верхушке зубцами. При рассматривании сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видно, что листовая пластинка с двух сторон опушена короткими одноклеточными волосками с острой верхушкой (ретортовидными), поэтому на ощупь она шершавая. Кроме того, с нижней стороны и по жилкам встречаются волоски с многоклеточным основанием и длинной конечной клеткой (жгучие). Цистолиты – беловатые округлые и эллиптические образования на темно-зелёном фоне.

Черешки листьев длиной до 8 см, округлые или полукруглые в сечении с бороздкой на верхней стороне, опушены густо жесткими ретортовидными волосками и реже – жгучими волосками или их основаниями.

Плод – орешек яйцевидной или эллиптической формы, в разной степени зрелости от зелёного, желтовато-зелёного до светлокоричневого цвета.

Цвет листьев с верхней стороны от зеленого до темно-зеленого, с нижней светлее – серовато-зеленый или зеленый; черешков – зеленый, желтовато-зелёный или серовато-зеленый. Запах слабый. Вкус водного извлечения горьковатый.

Измельченное сырье. Смесь кусочков листовых пластинок, черешков, редко – цветоносов, стеблей, отдельных цветков и семян, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки листовых пластинок от зеленого до темно-зелёного цвета с беловатыми округлыми и эллиптическими цистолитами, с мелкими торчащими ретортовидными волосками, с обломанными, редко цельными жгучими волосками или их чашевидными основаниями и вытянутыми ретортовидными волосками, особенно многочисленными по жилкам.

Видны кусочки черешков округлых или полукруглых в сечении, с бороздкой, густо опушенных ретортовидными волосками и реже встречающимися жгучими волосками или их основаниями. Редко встречаются овальные с заостренной верхушкой семена размером около 1 мм от светло-зеленого до светло-коричневого цвета, цветки или их части – мелкие, однополые с простым четырёхраздельным зелёным околоцветником, густо опушенные кусочки цветоносов, кусочки продольно-расщепленных стеблей с белой или желтовато-белой сердцевиной и наружной поверхностью зеленого, желтовато- или зеленовато-коричневатого цвета и плоды – орешки мелкие эллиптические или яйцевидные зеленовато-жёлтые.

Цвет измельченного сырья от зеленого до темно-зеленого с серо-зелеными, белыми, желто-белыми и коричневыми вкраплениями. Запах слабый. Вкус водного извлечения горьковатый.

Порошок. Смесь кусочков листовых пластинок, черешков, редко – цветоносов, стеблей, отдельных цветков (или их частей) и семян, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×)

видны: кусочки листовой пластинки с короткими ретортовидными волосками и остатками длинных ретортовидных и жгучих волосков, кусочки черешков и крупных жилок листа с волосками и их остатками; редко встречаются: овальные с заостренной верхушкой семена размером около 1 мм, мелкие (около 2 мм в диаметре) цельные светло-зеленые цветки или их части, листочки околоцветника, густоопушенные кусочки цветоносов, кусочки продольно-расщепленных стеблей, плоды-орешки яйцевидной или эллиптической формы.

Цвет порошка от серовато-зеленого до темно-зеленого, с беловатыми, коричневатыми, желтоватыми вкраплениями. Запах слабый. Вкус водного извлечения горьковатый.

Примечание. К недопустимым примесям относят:

а) Крапива жгучая (*Urtica urens* L.) – однолетнее, усаженное жгучими волосками растение с прямым или при основании восходящим 4-гранным стеблем. Листья супротивные, на длинных почти равных или немного короче пластинки черешках. Яйцевидные или эллиптические, коротко заостренные, при основании широко-клиновидные, реже закругленные, по краям крупно-остро-пильчатые, 2 – 5 см длиной и 1,5 – 3,5 см шириной. Прилистники ланцетовидные маленькие. Цветки однодомные. Те и другие собраны вместе прерывистыми ветвистыми колосьями, выходящими из пазух листьев.

б) Крапива коноплевая (*Urtica cannabina* L.) – многолетнее травянистое растение высотой 70 – 120 см, стебли ребристые прямостоячие, обыкновенно неветвистые, 4-гранные, усаженные жгучими и мелкими простыми волосками. Листья 7 – 5 см длиной и 6 – 12 см шириной, глубоко 3–5-рассеченные с перистозубчатыми надрезами. Цветки одно- или двудомные.

в) Яснотка белая (*Lamium album*., сем. Яснотковые – Lamiaceae) – стебли 20 – 100 см высотой, прямые, простые или ветвистые, в основном одиночные, покрытые одиночными вниз отклоненными волосками. Листья 2 – 10 см длиной, яйцевидные, при основании неглубоко-сердцевидные, верхние длиннозаостренные, по краю пиловиднозубчатые, рассеяно-волосистые, на черешках. Цветки в мутовках, расположены в пазухах листьев. Прицветники линейные, в 3 – 6 раз короче чашечек. Чашечки редко волосистые, зубцы их длиннее трубок, тонко и длинно заостренные. Венчики 2 – 2,5 см длиной, желтоватые, грязно-белые, изредка беловато-розовые; верхняя губа снаружи волосистая.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении листа с поверхности должны быть видно, что клетки верхнего эпидермиса –

многоугольные с прямыми или слабоизвилистыми стенками, нижнего – с сильноизвилистыми. Устьица расположены в основном на нижней стороне листа и окружены 3–5 клетками эпидермиса (аномоцитный тип). В некоторых клетках эпидермиса имеются продолговато-округлые с зернистой структурой и небольшим пятном в центре – просвечивающейся ножкой – кристаллические включения (цистолиты). Волоски с обеих сторон листа 3 типов: жгучие, ретортовидные и головчатые. Жгучие волоски представляют собой клетку, с одной стороны вытянутую в полый тонкий длинный конец в виде иглы с верхушкой, оканчивающейся легко обламывающейся головкой, а с другой стороны расширенную в продолговатую эллиптическую полость (капсулу), погружённую в многоклеточное основание – подставку из эпидермальных клеток. Ретортовидные волоски – одноклеточные, с округлым расширенным основанием, слегка погружённым в эпидермис, и с вытянутой заостренной верхушкой. Головчатые волоски – мелкие с двух-, реже трехклеточной шаровидной головкой на одноклеточной ножке.

Сосуды крупных жилок и черешка («давленый» препарат) сопровождаются мелкими друзами, образующими характерные цепочки.

Измельченное сырье. При рассмотрении кусочков листьев с поверхности должны быть видны многоугольные клетки эпидермиса с прямыми, слабоизвилистыми или с сильноизвилистыми стенками. Устьица аномоцитного типа расположены, в основном, на одной стороне листовой пластинки. В некоторых клетках эпидермиса имеются продолговато-округлые с зернистой структурой и небольшим пятном в центре – просвечивающейся ножкой - цистолиты. Волоски или их обломки с обеих сторон листа 3 типов: ретортовидные, жгучие, головчатые.

Сосуды крупных жилок и черешка («давленый» препарат) сопровождаются мелкими друзами, образующими характерные цепочки.

Порошок. При рассмотрении микропрепаратов порошка под микроскопом должны быть видны: фрагменты листа с эпидермисом из клеток с извилистыми или прямыми стенками; устьица аномоцитного типа;

часто встречаются цистолиты в виде продолговатых, округлых и неправильной формы образований зернистой структуры, в центре которых, как правило, хорошо заметно основание ножки в виде кружочка; встречаются волоски 3 типов – ретортовидные, жгучие и головчатые; ретортовидные волоски одноклеточные, с расширенным основанием, встречаются как в виде обломков, так и неповрежденные; жгучие волоски, состоящие из многоклеточного основания и погруженной в него крупной конечной клетки с легко обламывающейся головкой, чаще встречаются обломанными; реже встречаются мелкие головчатые волоски с двух- или трехклеточной головкой на одноклеточной ножке.

Иногда встречаются фрагменты тканей черешков и крупных жилок с цепочками мелких друз оксалата кальция вдоль сосудов, имеющих спиральные вторичные утолщения стенок.

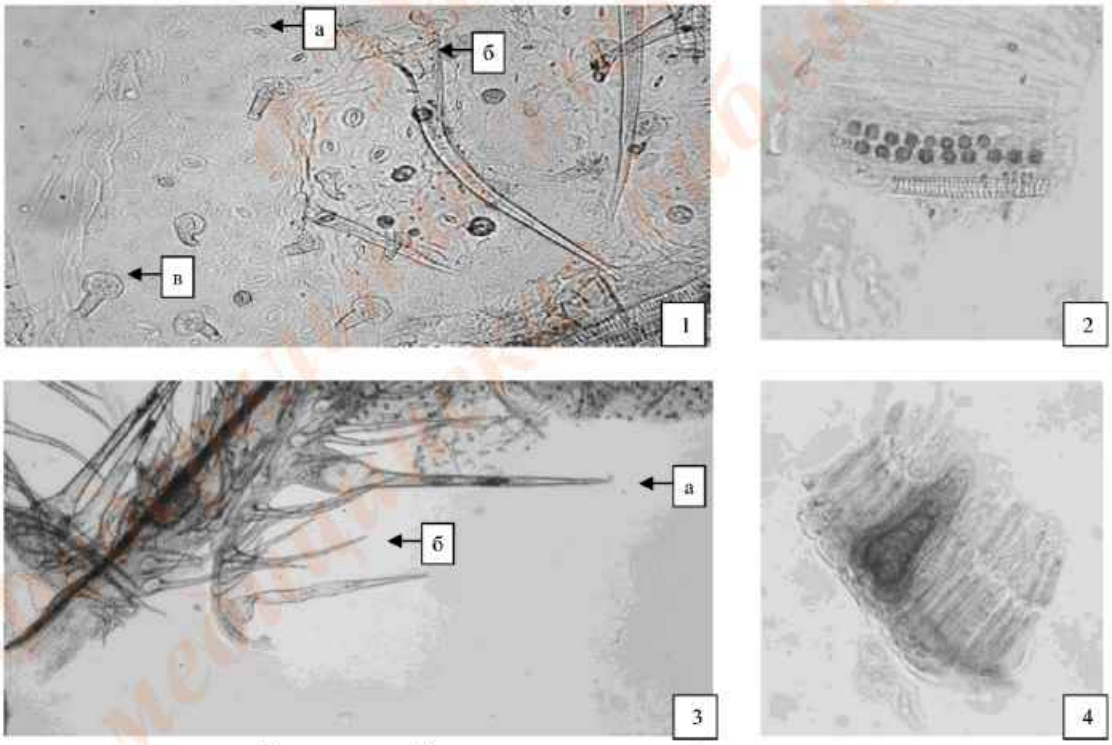


Рисунок – Крапивы двудомной листья.
1 – фрагмент эпидермиса: а – устьица аномоцитного типа,б – ретортовидный волосок, в – головчатый волосок (200×), 2 – фрагмент жилки с друзами оксалата кальция (200×), 3 – фрагмент эпидермиса: а – жгучий волосок, б – ретортовидные волоски (40×), 4 – фрагмент листовой пластинки в поперечном сечении с цистолитом (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) хлорогеновой кислоты. Около 0,020 г СО хлорогеновой кислоты растворяют в спирте 96 % в мерной колбе вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают. Срок годности раствора 3 мес при хранении в хорошо укупоренной упаковке, в прохладном защищенном от света месте.

Дифенилборной кислоты 2-аминоэтилового эфира раствор 1 % в спирте 96 %. 1,0 г дифенилборной кислоты 2-аминоэтилового эфира растворяют в 100 мл спирта 96 %. Срок годности 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор СО витамина K_1. Около 0,02 г СО витамина K_1 растворяют в гексане в мерной колбе вместимостью 25 мл, доводят объем раствора гексаном до метки и перемешивают. Срок годности раствора 30 сут при хранении в хорошо укупоренной упаковке, в прохладном защищенном от света месте.

1. Около 1,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,2 мм, помещают в плоскодонную коническую колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 10 мл спирта 96 % и нагревают с обратным холодильником на водяной бане в течение 15 мин. Затем содержимое колбы охлаждают и фильтруют через бумажный фильтр. Полученный фильтрат высушивают под вакуумом при температуре 40 °С досуха. К сухому остатку прибавляют 2 мл спирта 96 % (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля на алюминиевой подложке размером 10×10 см наносят 10 мкл испытуемого раствора и 5 мкл раствора СО хлорогеновой кислоты.

Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе в течение 5 – 10 мин, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин смесью растворителей муравьиная кислота безводная – метанол – этилацетат (2,5:4:50), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителя пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей,

нагревают в сушильном шкафу при 100 – 105 °С в течение 3 – 5 мин, обрабатывают дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира раствором 1 % в спирте 96 %, и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО хлорогеновой кислоты должна обнаруживаться зона адсорбции с интенсивной синеголубой флуоресценцией.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться зона адсорбции с интенсивной сине-голубой флуоресценцией на уровне зоны на хроматограмме растворов СО хлорогеновой кислоты и зона адсорбции с интенсивной синей флуоресценцией выше зоны хлорогеновой кислоты; допускается обнаружение других зон адсорбции.

2. Около 1,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,25 мм, помещают в плоскодонную коническую колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 10 мл гексана и перемешивают на механическом встряхивателе в течение 3 ч. Затем фильтруют через бумажный фильтр, отгоняют растворитель на ротационном испарителе при температуре водяной бани не выше 45 °С до объема 2–3 мл (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором на алюминиевой подложке размером 10×15 см наносят 100 мкл испытуемого раствора и 10 мкл раствора СО витамина $К_1$.

Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе при комнатной температуре в течение 5 – 10 мин, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин верхним слоем смеси растворителей гексан – хлороформ (8:3), 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 просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм в течение не менее 2

мин.

На хроматограмме раствора СО витамина $К_1$ должна обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией желто-зеленого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться основная зона адсорбции с флуоресценцией желто-зеленого цвета на уровне зоны адсорбции витамина $К_1$; допускается обнаружение других зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

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

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 20 %.

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 7 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 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

Сырье, изменившее окраску (потемневшее и почерневшее). *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 5 %.

Другие части растения (стебли, соцветия и пр.). *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 5 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 2 %.

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

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

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:* сумма оксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту – не менее 0,3 %.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих через сито с отверстиями размером 1 мм. Около 0,5 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в круглодонную колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл спирта 70 %. Колбу с содержимым присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. После охлаждения извлечение фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. Экстрагирование повторяют еще раз в описанных выше условиях. Полученное извлечение фильтруют в ту же мерную колбу. Объединенные извлечения в мерной колбе доводят спиртом 70 % до метки и перемешивают (раствор А).

2,0 мл раствора А переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б). Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре при длине волны 330 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют спирт 96 %.

Федеральный ЭМБ медицинской библиотеки

Содержание суммы оксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 2 \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б;

$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения хлорогеновой кислоты при длине волны 330 нм, равный 507;

a – навеска сырья, г;

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».

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Красавки трава	**ФС.2.5.0020.15**
Belladonnae herba	**Взамен ФС 42-1104-77**

Собранная в период от бутонизации до массового плодоношения и высушенная трава культивируемых многолетних травянистых растений красавки обыкновенной – *Atropa belladonna* L. и красавки кавказской – *Atropa caucasica Kreyer*, сем. пасленовых – *Solanaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Смесь облиственных стеблей и их кусков, иногда с цветками и плодами различной степени развития, измельченных, реже цельных листьев, черешков, бутонов, цветков и плодов. Стебли цилиндрические или сплюснутые, слегка ребристые, с рыхлой белой сердцевиной или полые. Листья очередные или попарно сидячие, эллиптические, яйцевидные или продолговато-яйцевидные, к верхушке заостренные, к основанию суживающиеся в короткий черешок, цельнокрайние, с тонкими, ломкими пластинками, длиной до 20 см, шириной до 10 см, в сырье часто смятые и изломанные. Цветки одиночные или парные, сидячие на коротких железистоопушенных цветоносах. Венчик трубчато-колокольчатый, чашечка пятизубчатая. Плод – шаровидная ягода с остающейся чашечкой. Цвет стеблей от светло-зеленого до коричневато- или зеленовато-фиолетового, листьев – зеленый или коричневато-зеленый, снизу более светлый; цветков – коричневато-фиолетовый или желтый; плодов – в зависимости от степени зрелости – зеленый, коричневато-фиолетовый или черный. Запах слабый. Вкус водного извлечения не определяется (сырье ядовито).

Федеральный электронный медицинский библиотека ФЭМБ

Измельченное сырье. Кусочки стеблей, листьев, цветков и плодов, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки слегка ребристых стеблей с одной стороны – от светло-зеленого до коричневато- или зеленовато-фиолетового цвета, с другой стороны – белые; кусочки листовой пластинки с одной стороны – зеленого или буровато-зеленого цвета, с другой – более светлые; фрагменты цветков коричневато-фиолетового или желтого цвета, фрагменты чашечки зеленого цвета; фрагменты плодов – зеленого, коричневато-фиолетового или черного цвета.

Цвет измельченного сырья серовато-зеленый с фиолетовыми и желтыми вкраплениями. Запах слабый. Вкус водного извлечения не определяется (сырье ядовито).

Микроскопические признаки. *Цельное и измельченное сырье.* При рассмотрении листа с поверхности должны быть видны клетки эпидермиса с извилистыми боковыми стенками и складчатой кутикулой, которая хорошо заметна вокруг устьиц. Устьица многочисленные, окружены 3 – 4 околоустьичными клетками, из которых одна значительно мельче других (анизоцитный тип), преобладают на нижней стороне листовой пластинки. Встречаются головчатые и простые волоски. Головчатые волоски двух типов: с длинной многоклеточной ножкой и одноклеточной головкой, с одноклеточной ножкой и многоклеточной (из 4 – 6 клеток) головкой. Простые волоски 2–3-(реже 6)-клеточные, с тонкими стенками. В губчатой паренхиме видны овальные клетки, заполненные мелким кристаллическим песком оксалата кальция. При малом увеличении они имеют вид темных, почти черных пятен, при большом – сероватые с различимой кристаллической зернистостью. Очень редко в центре клетки с кристаллическим песком можно различить друзы или призматические кристаллы оксалата кальция, иногда встречаются отдельные друзы и призматические кристаллы оксалата кальция.

При рассмотрении с поверхности верхней части лепестков должны быть видны клетки эпидермиса с сосочковидными выростами и складчатой кутикулой. В средней и нижней части лепестка клетки эпидермиса с сильноизвилистыми боковыми стенками. Устьица анизоцитного типа, расположенные с наружной стороны. На поверхности лепестков имеются многочисленные простые многоклеточные волоски и головчатые волоски с длинной многоклеточной ножкой и одноклеточной головкой. Встречаются пыльцевые зерна с тремя порами.

На поверхности чашелистиков и цветоножек должны быть видны клетки эпидермиса с сильноизвилистыми боковыми стенками и складчатой кутикулой, устьица анизоцитного типа, имеются многочисленные простые и головчатые волоски, характерные для сырья красавки, и их фрагменты. В губчатой паренхиме встречаются цистолиты, отдельные друзы и призматические кристаллы оксалата кальция.

При рассмотрении эпидермиса плода с поверхности должны быть видны четырех-шестиугольные клетки с равномерно утолщенными стенками и желто-коричневым содержимым. На поверхности эпидермиса редкие одиночные одноклеточные, слегка извилистые, на концах заостренные, толстостенные волоски. Мякоть плода состоит из клеток округлой или овальной формы, содержащих клетки с кристаллическим песком оксалата кальция. При рассмотрении давленого препарата плода виден эпидермис кожуры семени, который состоит из характерных палисадных клеток с неравномерно утолщенной оболочкой, и каплями масла.

При рассмотрении микропрепарата стебля должны быть видны продольно вытянутые клетки эпидермиса с прямыми стенками и продольной складчатой кутикулой, устьица анизоцитного типа, на поверхности встречаются волоски, характерные для сырья красавки. Паренхима стебля состоит из тонкостенных клеток овальной или вытянутой формы, встречаются механические волокна, продольно вытянутые клетки с

кристаллическим песком оксалата кальция, сосуды спирального, кольчатого и сетчатого типа.

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля на полимерной подложке размером 10×15 см наносят 20 мкл испытуемого раствора (см. «Количественное определение» приготовление раствора 2). Пластинку с нанесенной пробой сушат при комнатной температуре, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин системой растворителей ацетон – аммиака раствор 10 % (95:5), 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 реактивом Драгендорфа.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться доминирующая зона адсорбции оранжевого цвета; допускается обнаружение других зон адсорбции.

Федеральная электронная медицинская библиотека

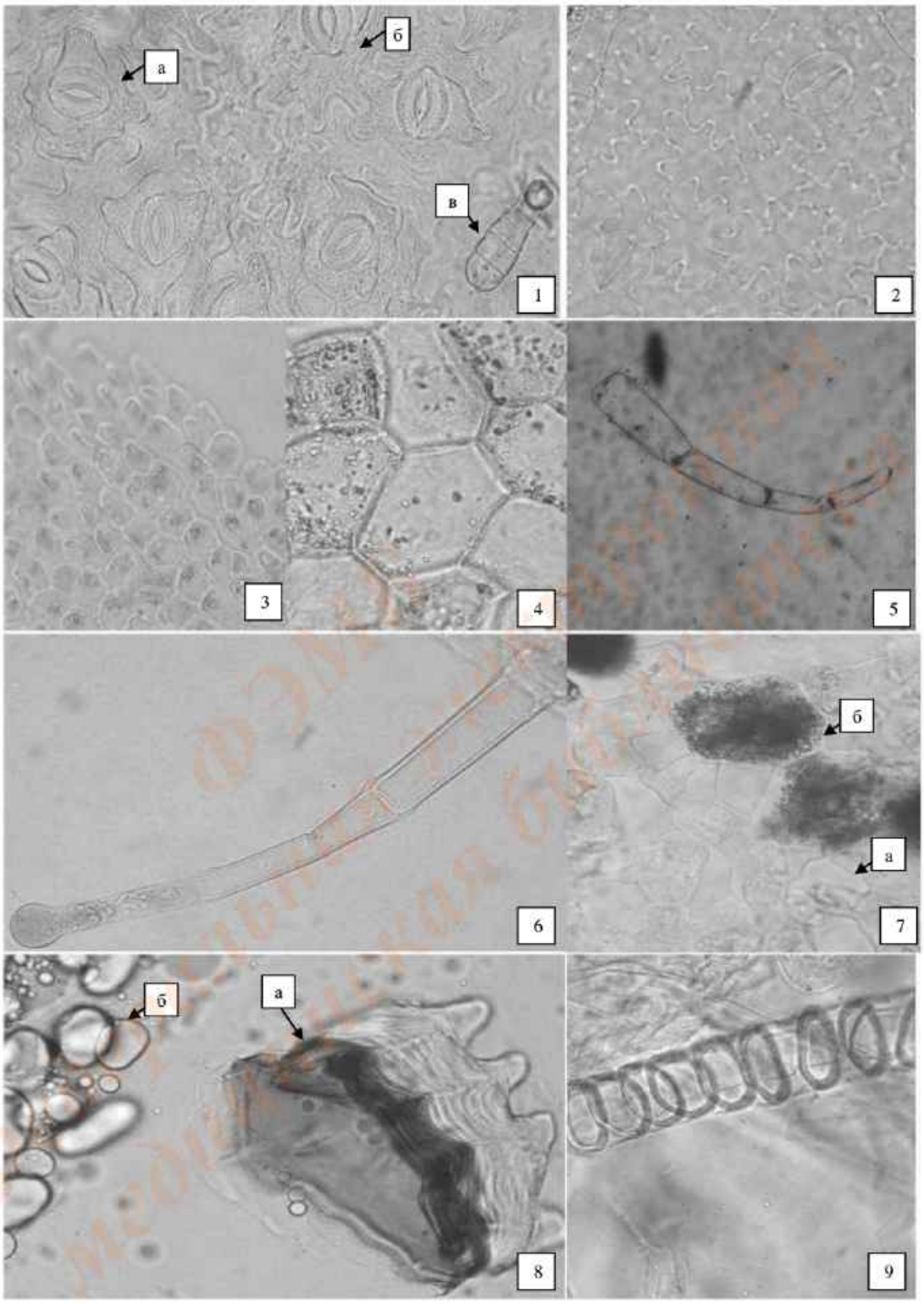

а
б
в
1
2
3
4
5
6
б
а
7
б
а
8
9

Рисунок – Красавки трава.
1 – фрагмент эпидермиса листа: а – устьица анизоцитного типа, б – складчатость кутикулы, в – головчатый волосок (200×), 2 – фрагмент сильно извилистых клеток эпидермиса лепестка (200×), 3 – сосочковидные выросты на эпидермисе лепестка (200×), 4 – фрагмент эпидермиса плода (200×), 5 – простой волосок (40×), 6 – головчатый волосок (200×), 7 – губчатая паренхима (а) и клетки с кристаллическим песком (б) (200×), 8 – фрагмент семени: а – палисадные клетки с неравномерно утолщенной оболочкой, б – капли масла (200×), 9 – сосуд кольчатого типа (200×).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 13 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 13 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье*: частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %; *измельченное сырье:* 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 %.

Посторонние примеси

Листья. *Цельное сырье* – не менее 45 %.

Частицы сырья, изменившие окраску. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 4 %.

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

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – 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».

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

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 и измельченное сырье*: сумма алкалоидов в пересчете на гиосциамин – не менее 0,35 % и не более 0,4 %.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 10,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 150 мл эфира, 7 мл аммиака раствора и взбалтывают в течение 1 ч. Эфирное извлечение быстро фильтруют через вату в колбу вместимостью 200 мл, прикрывая воронку часовым стеклом. К фильтрату прибавляют 5 мл воды, энергично взбалтывают и оставляют в покое до просветления эфирного слоя, после чего 90 мл эфирного извлечения переносят в делительную воронку вместимостью 200 мл. Цилиндр дважды ополаскивают эфиром порциями по 10 мл, которые присоединяют к эфирному извлечению в делительной воронке (раствор 1).

Из эфирного извлечения алкалоиды экстрагируют последовательно 20, 15, 10 мл хлористоводородной кислоты раствора 1 % до полного их извлечения (проба с реактивом Майера), каждый раз фильтруя полученное извлечение через смоченный водой бумажный фильтр диаметром 5 см во вторую делительную воронку вместимостью 200 мл. Фильтр промывают дважды хлористоводородной кислоты раствором 1 % по 5 мл, присоединяя промывную жидкость к общему кислотному извлечению.

Кислотное извлечение подщелачивают раствором аммиака до щелочной реакции по фенолфталеину и алкалоиды извлекают последовательно 20, 15, 10 мл хлороформа, взбалтывая по 3 мин каждый раз, и хлороформное извлечение фильтруют в колбу для отгонки вместимостью 100 мл через бумажный фильтр, на который предварительно помещают 4 – 5 г свежепрокаленного натрия сульфата безводного, смоченного хлороформом. Фильтр промывают хлороформом дважды по 5 мл (раствор 2). Хлороформ отгоняют на роторном испарителе до объема около 1 – 2 мл, остаток хлороформа в колбе удаляют продуванием воздуха до полного исчезновения запаха растворителя. Сухой остаток растворяют в 15 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,02 М при подогревании на водяной бане при температуре 60 °С, прибавляют 2 капли метилового красного раствора спиртового и 1 каплю метиленового синего, и избыток хлористоводородной кислоты оттитровывают натрия гидроксида раствором 0,02 М до появления зеленой окраски.

Содержание суммы алкалоидов в пересчете на гиосциамин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{(15 - V) \cdot 0{,}005780 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot (100 - W)},$$

где V – объем натрия гидроксида раствора 0,02 М, пошедшего на титрование, мл;

0,005780 – количество алкалоидов в пересчете на гиосциамин, соответствующее 1 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,02 М;

a – навеска сырья, соответствующая объему эфирного извлечения, взятого на анализ, г;

W – влажность сырья, %.

Примечание. В случае завышенного содержание суммы алкалоидов (в пересчете на гиосциамин в % расчет количества лекарственного растительного сырья необходимого для производства лекарственного препарата следует проводить по формуле, приведенной в ОФС «Лекарственное растительное сырье. Фармацевтические субстанции растительного происхождения».

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».

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Крушины ольховидной кора	**ФС.2.5.0021.15**
Frangulae alni cortex	**Взамен ГФ X ст. 183**
	Взамен ГФ XI ст. 2
	(изм. № 2 от 20.08.1997)

Собранная весной до начала цветения кора стволов и ветвей дикорастущего кустарника или небольшого деревца крушины ольховидной (син.: крушина ломкая) – *Frangula alnus Mill.* (syn.: *Rhamnus frangula* L.), сем. крушиновых – *Rhamnaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Трубчатые или желобоватые куски коры различной длины, толщиной 0,5 – 2 мм. Наружная поверхность коры более или менее гладкая, темно-коричневая, серо-коричневая, темно-серая или серая, часто с беловатыми поперечно-вытянутыми чечевичками или серыми пятнами, при легком соскабливании наружной части пробки обнаруживается красный слой. Внутренняя поверхность гладкая, желтовато-оранжевого или красновато-коричневого цвета. При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) излом светло-желтый, равномерно мелкощетинистый. Запах слабый. Вкус водного извлечения горьковатый.

Измельченное сырье. Кусочки коры различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет коры с наружной стороны темно-коричневый, серо-коричневый, темно-серый или серый, с внутренней - желтовато-оранжевый или красновато-коричневый. Запах слабый. Вкус водного извлечения – горьковатый.

Порошок. При рассмотрении порошка под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видна смесь частиц коры желтовато-коричневого цвета с коричневыми, темно-коричневыми, серо-коричневыми, темно-серыми, серыми вкраплениями, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Запах слабый. Вкус водного извлечения горьковатый.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении поперечного среза должен быть виден темно-красный, широкий пробковый слой в 10 – 20 рядов клеток, прерванный во многих местах чечевичками. Далее лежит пластинчатая колленхима. Наружная кора состоит из овальных клеток и содержит большое количество друз оксалата кальция; в некоторых клетках встречаются крахмальные зерна. Механические волокна с мало утолщенными и слабо одревесневшими оболочками. Сердцевинные лучи часто изогнутые, одно-, двух-, реже трехрядные с желтым содержимым. Между сердцевинными лучами расположены группы желтоватых одревесневших лубяных волокон с толстыми стенками, окруженные кристаллоносной обкладкой и образующие концентрические пояса.

Измельченное сырье. При рассмотрении давленного препарата должны быть видны фрагменты темно-красной пробковой ткани, группы желтоватых одревесневших лубяных волокон с кристаллоносной обкладкой, друзы, одиночные кристаллы оксалата кальция.

Порошок. При рассмотрении микропрепарата должны быть видны фрагменты темно-красной пробковой ткани; группы желтоватых одревесневших лубяных волокон с толстыми стенками, окруженные кристаллоносной обкладкой; друзы и одиночные кристаллы оксалата кальция.

Электронный архив библиотеки Гомельского государственного медицинского университета

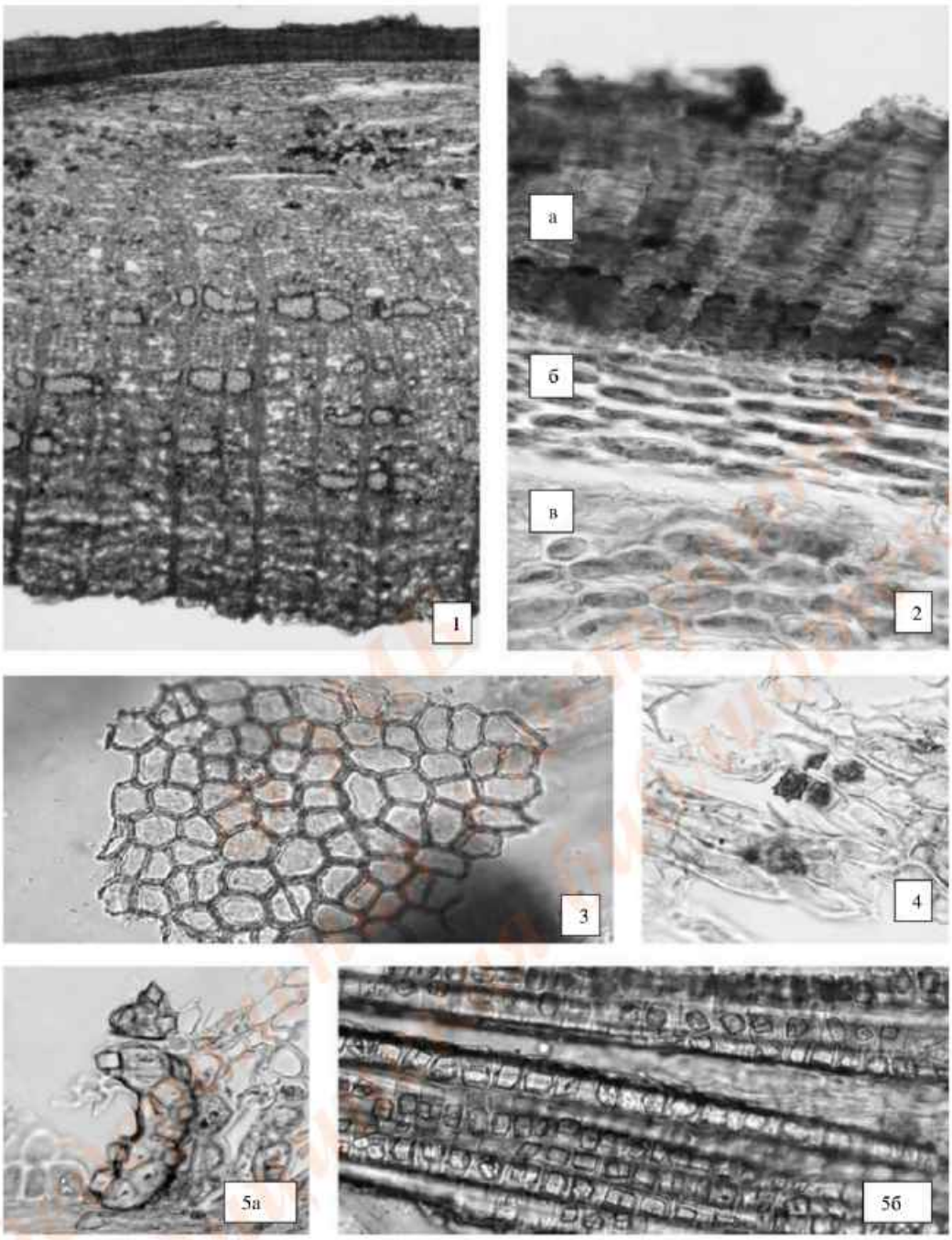


Рисунок – Крушины ольховидной кора.
1 – поперечный срез коры (40×), 2 – фрагмент поперечного среза коры:
а – пробка, б – колленхима, в – первичная кора (200×), 3 – фрагмент пробки (200×), 4 – фрагмент паренхимы с друзами оксалата кальция (200×),
5 – фрагмент лубяных волокон с кристаллоносной обкладкой:
а – поперечный срез, б – давленый препарат (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

1. ***Тонкослойная хроматография***

Приготовление растворов.

Раствор для детектирования. Около 0,5 г калия гидроксида растворяют в 10 мл спирта 50 %. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор стандартного образца (СО) барбалоина. Около 0,005 г СО барбалоина (алоина) растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в хорошо укупоренной упаковке, в прохладном защищенном от света месте.

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

На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля на алюминиевой подложке размером 10×10 см наносят 5 мкл испытуемого раствора и рядом 10 мкл раствора СО барбалоина.

Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре в течение 5 мин, помещают в камеру (выложенную изнутри фильтровальной бумагой), предварительно насыщенную в течение не менее 60 мин смесью растворителей этилацетат – спирт 96 % – вода (100:17:13), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, пластинку вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, обрабатывают раствором для детектирования, сушат в сушильном шкафу при 100 – 105 °С в течение 3 – 5 мин и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО барбалоина должна обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией коричнево-желтого, зелено-желтого или желтого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться 2 зоны адсорбции с флуоресценцией оранжево-красного или оранжевого

цвета, допускается обнаружение других зон адсорбции; не допускается обнаружение зоны от желтого до красно-оранжевого цвета на уровне зоны СО барбалоина

2. При смачивании внутренней поверхности коры или порошка коры 1 – 2 каплями натрия гидроксида раствора 10 % должно наблюдаться кроваво-красное окрашивание (антраценпроизводные).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 15 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 5 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 0,6 %.

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 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 %.

Посторонние примеси

Участки коры, покрытые кустистыми лишайниками. *Цельное сырье* – не более 1 %.

Участки коры с остатками древесины. *Цельное сырье* – не более 1 %.

Куски коры толще 2 мм. *Цельное сырье* – не более 3 %.

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

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

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

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:* сумма антрагликозидов в пересчете на истизин или глюкофрангулин А – не менее 4,5 %.

Сумма антрагликозидов в пересчете на глюкофрангулин А

Приготовление растворов.

Натрия карбоната раствор 5 %. 5,0 г натрия карбоната безводного растворяют в воде, доводят объем раствора водой до 100 мл и перемешивают. Срок годности раствора не более 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Железа(III) хлорида раствор (плотность 1,07 – 1,08). 20,0 г железа(III) хлорида растворяют в 100 мл воды, доводят водой до величины плотности 1,07 – 1,08 и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в хорошо укупоренной упаковке, в прохладном защищенном от света месте.

Магния ацетата раствор спиртовой 0,5 %. 0,5 г магния ацетата растворяют в спирте 96 %, доводят объем раствора тем же спиртом до 100 мл и перемешивают. Срок годности раствора не более 2 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Для анализа используется эфир диэтиловый квалификации «химически чистый».

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм. Около 0,25 г

(точная навеска) сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 25 мл спирта 80 %, взвешивают с погрешностью ± 0,01 г, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 мин. После охлаждения до комнатной температуры колбу вновь взвешивают и доводят до первоначальной массы спиртом 80 %. Содержимое колбы фильтруют через бумажный складчатый фильтр.

5,0 мл фильтрата помещают в делительную воронку вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл воды и 0,1 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и осторожно взбалтывают в течение 2 – 3 мин с 20 мл петролейного эфира (х.ч.). После полного расслоения фаз нижний водный слой переносят в стакан вместимостью 100 мл, верхний эфирный слой переносят в колбу вместимостью 250 мл. Далее водный слой из стакана переносят в ту же делительную воронку и аналогичным образом обрабатывают еще 4 раза петролейным эфиром (порциями по 20 мл). Водный слой переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл. Объединенные петролейные извлечения переносят обратно в делительную воронку и промывают водой 2 раза (порциями по 15 мл), водный слой помещают в ту же мерную колбу вместимостью 100 мл, оставляя темные хлопья в эфирном слое. В мерную колбу с объединенными водными извлечениями прибавляют 5 мл натрия карбоната раствора 5 % и доводят объем раствора водой до метки (раствор А).

50,0 мл раствора А пипеткой переносят в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 20 мл железа(III) хлорида раствора (плотность 1,07 – 1,08), присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане при периодическом перемешивании в течение 20 мин, погружая колбу в воду бани выше уровня раствора в колбе. Затем в колбу прибавляют 2 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и продолжают нагревать в течение 20 мин, часто встряхивая, до растворения осадка.

Колбу охлаждают, и ее содержимое переносят в делительную воронку

вместимостью 500 мл, колбу ополаскивают 30 мл эфира, присоединяют к основному раствору в делительной воронке и осторожно взбалтывают в течение 2 – 3 мин. После полного расслоения фаз нижний водный слой переносят в ту же колбу вместимостью 250 мл, а эфирный слой собирают в колбу вместимостью 100 мл. Извлечение повторяют еще 2 раза аналогичным образом. Объединенные эфирные извлечения переносят обратно в делительную воронку и промывают 2 раза водой (по 15 мл), водный слой отбрасывают. Эфирные извлечения фильтруют через воронку с бумажным фильтром, содержащим 3,0 г натрия сульфата безводного, в мерную колбу вместимостью 100 мл. Воронку с натрия сульфатом безводным промывают эфиром и доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (раствор Б).

Через 60 мин 20,0 мл раствора Б пипеткой переносят в низкий стеклянный стакан или бюкс вместимостью 100 мл и сушат досуха в вытяжном шкафу. Сухой остаток полностью растворяют в 10 мл магния ацетата спиртового раствора 0,5 % (раствор В).

Оптическую плотность раствора В измеряют на спектрофотометре при длине волны 515 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения спирт 96 %.

Содержание суммы антрагликозидов в пересчете на глюкофрангулин А в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 10 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 5 \cdot 50 \cdot 20 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 245{,}10}{a \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора В;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения глюкофрангулина А при длине волны 515 нм, равный 204;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Сумма антрагликозидов в пересчете на истизин

Щелочно-аммиачный раствор. 50,0 г натрия гидроксида растворяют при перемешивании в 870 мл воды. После охлаждения раствора прибавляют 80,0 мл аммиака раствора концентрированного 25 % и перемешивают. Срок годности раствора 1 сут.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 0,05 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 7,5 мл уксусной кислоты ледяной и нагревают смесь на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 15 мин. После охлаждения в колбу прибавляют через холодильник 30 мл эфира и кипятят на водяной бане в течение 15 мин. Затем извлечение охлаждают, фильтруют через вату в делительную воронку вместимостью 300 мл и вату промывают 20 мл эфира. Вату переносят обратно в колбу, прибавляют 30 мл эфира и кипятят в течение 10 мин. Охлажденное эфирное извлечение фильтруют через вату в ту же делительную воронку. Колбу дважды ополаскивают эфиром (по 10 мл) и фильтруют через ту же вату. К объединенным извлечениям осторожно, по стенкам прибавляют 100 мл щелочно-аммиачного раствора и осторожно взбалтывают в течение 5 – 7 мин, охлаждая воронку под струей холодной воды. После полного расслоения прозрачный красный нижний слой, не фильтруя, сливают в мерную колбу вместимостью 250 мл, а эфирный слой обрабатывают порциями по 20 мл щелочно-аммиачного раствора до прекращения окрашивания жидкости, сливают окрашенные растворы в ту же мерную колбу и доводят объем раствора в колбе щелочно-аммиачным раствором до метки.

25,0 мл полученного раствора помещают в колбу и нагревают в течение 15 мин на кипящей водяной бане с обратным холодильником. После охлаждения измеряют оптическую плотность раствора на фотоэлектроколориметре при длине волны около 540 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения щелочно-

аммиачный раствор. При получении слишком интенсивной окраски раствор перед колориметрированием разбавляют щелочно-аммиачным раствором.

Концентрацию антрагликозидов в пересчете на истизин в растворе определяют по калибровочному графику.

Содержание антрагликозидов в пересчете на истизин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{C \cdot 250 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot (100 - W)},$$

где C – концентрация антрагликозидов в пересчете на истизин в 1 мл раствора, найденное по калибровочному графику, г;
a – навеска сырья, г;
W – влажность сырья, %.

Построение калибровочного графика. 50,0 г кобальта хлорида ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$), высушенного до постоянной массы, помещают в мерную колбу вместимостью 500 мл, растворяют в 250 мл воды, прибавляют 1 мл хлористоводородной кислоты, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Из этого раствора готовят серию разбавленных растворов (№ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12), содержащих кобальта хлорида соответственно 0,0025; 0,0050; 0,0075; 0,0100; 0,0125; 0,0150; 0,0175; 0,0200; 0,0225; 0,0250; 0,0275; 0,0300 г в 1 мл, и измеряют их оптическую плотность на фотоэлектроколориметре при длине волны около 530 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения воду. Для построения калибровочного графика по оси абсцисс откладывают концентрацию растворов, а по оси ординат – их оптическую плотность. При этом концентрации растворов кобальта хлорида выражают в соответствующих концентрациях антраценопроизводных (в пересчете на истизин), пользуясь таблицей.

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

Таблица – Соотношения содержания антраценопроизводных в пересчете на истизин содержащего кобальта хлорида ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$), г/мл в растворе

№ п/п	Содержание кобальта хлорида ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$), г/мл	Содержание антраценопроизводных в пересчете на истизин, г/мл
1	0,0025	0,0000009
2	0,0050	0,0000018
3	0,0075	0,0000027
4	0,0100	0,0000036
5	0,0125	0,0000045
6	0,0150	0,0000054
7	0,0175	0,0000063
8	0,0200	0,0000072
9	0,0225	0,0000081
10	0,0250	0,0000090
11	0,0275	0,0000099
12	0,0300	0,0000108

Примечание. Определение суммы антрагликозидов в пересчете на истизин проводят в сырье, предназначенном для получения экстракта сухого; определение суммы антрагликозидов в пересчете на глюкофрангулин А проводят в сырье, предназначенном для производства лекарственных растительных препаратов (пачки, фильтр-пакеты).

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».

Федеральная электронная медицинская библиотека

Ландыша трава	**ФС.2.5.0022.15**
Ландыша листья	
Ландыша цветки	
Convallariae herba	
Convallariae folia	**Взамен ГФ X ст. 322**
Convallariae flores	**Взамен ГФ XI ст. 49**

Собранная и высушенная трава (в период цветения), листья до цветения и в начале цветения, цветки (в период цветения) многолетнего дикорастущего травянистого растения ландыша майского – *Convallaria majalis* L., ландыша закавказского – *Convallaria transcaucasica Utkin ex Grossh.* и ландыша Кейске – *Convallaria keiskei Mig.*, сем. лилейных – *Liliaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье. Трава.* Смесь цельных, реже изломанных листьев, соцветий с цветоносами, отдельных цветков и кусочков цветоносов. Листья эллиптической или ланцетовидной формы с заостренной верхушкой, суживающиеся у основания и постепенно переходящие в длинные замкнутые влагалища, отдельные или по 2 – 3 охватывающие друг друга. Край листа цельный, жилкование дугонервное. Лист тонкий, ломкий, с голой и слегка блестящей поверхностью. Длина листьев до 20 см, ширина – до 8 см. Соцветие – односторонняя рыхлая кисть из 3 – 12 (20) желтоватых цветков на ребристом голом цветоносе, длиной до 20 см, толщиной до 1,5 мм. Цветки обоеполые с венчиковидным колокольчатым

околоцветником, сростнолепестные, с 6 короткими отогнутыми зубчиками, на коротких цветоножках, с пленчатыми линейными прицветниками. Цвет листьев зеленый, реже коричневато-зеленый, цветков – желтоватый, цветоносов – светло-зеленый. Запах слабый. Вкус водного извлечения не определяется (сырье ядовито).

Листья. Цельные, реже изломанные, эллиптической или ланцетовидной формы с заостренной верхушкой, суживающиеся у основания и постепенно переходящие в длинные влагалища; отдельные или соединенные вместе по 2 – 3, край листа цельный, жилкование дугонервное. Листовая пластинка, тонкая, ломкая, с голой и слегка блестящей поверхностью. Длина листьев до 20 см, ширина – до 8 см. Цвет листьев зеленый, реже коричневато-зеленый. Запах слабый. Вкус водного извлечения не определяется (сырье ядовито).

Цветки. Смесь соцветий с остатками цветоносов длиной до 20 см, цветков и иногда кусочков цветоносов. Цветонос ребристый, голый, толщиной до 1,5 мм, с односторонней рыхлой кистью из 3 – 12 (20) желтоватых цветков. Цветки обоеполые с венчиковидным колокольчатым околоцветником, сростнолепестные, с 6 короткими отогнутыми зубчиками, на коротких цветоножках, с пленчатыми линейными прицветниками. Тычинок 6, на коротких нитях, прикрепленных к основанию околоцветника; завязь верхняя, трехгнездная, столбик с расширенным трехлопастным рыльцем. Цвет цветоносов – светло-зеленый, цветков – желтоватый. Запах слабый. Вкус водного извлечения не определяется (сырье ядовито).

Измельченное сырье. Трава. При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки листьев (зеленого, реже коричневато-зеленого цвета), цветоносов (слабо-зеленого цвета) и цветков (желтоватого цвета), проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм. Запах слабый. Вкус водного извлечения не определяется (сырье ядовито).

Листья. Кусочки листьев различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм. Цвет листьев зеленый, реже коричневато-

зеленый. Запах слабый. Вкус водного извлечения не определяется (сырье ядовито).

Микроскопические признаки. *Цельное сырье, измельченное сырье. Листья.* При рассмотрении листа с поверхности с обеих сторон должны быть видны вытянутые по длине листа клетки эпидермиса овальной, прямоугольной, широковеретеновидной, ромбовидной и комбинированной формы с прямыми стенками. Стенки клеток имеют четковидное утолщение. Устьица погруженные, овальные, окружены 4 клетками эпидермиса (тетрацитный тип). Под верхним эпидермисом должны быть видны клетки палисадной ткани, вытянутые по ширине листа ("лежачая" палисадная ткань). Губчатая ткань рыхлая и состоит из разветвленных клеток, вытянутых по ширине листа. В отдельных клетках мезофилла видны пучки тонких рафид и крупные игольчатые кристаллы (стилоиды) оксалата кальция.

Цветки. Эпидермис венчика с обеих сторон состоит из клеток с ровными тонкими стенками многоугольной формы. Кутикула продольно-морщинистая. Устьица погруженные, округлые, ориентированы по длине околоцветника, окружены 4 – 5 клетками эпидермиса (тетра- и пентацитный тип). Эпидермис зубчика с сосочковидными выростами, по краю с одноклеточными бахромчатыми волосками. В ткани околоцветника присутствуют идиобласты, содержащие слизь и тонкие рафиды кальция оксалата, встречаются крупные игольчатые кристаллы – стилоиды. Пыльца шаровидной формы с гладкой поверхностью.

Эпидермис цветоноса состоит из клеток прямоугольной и прямоугольно-веретеновидной формы с прямыми стенками и ровной кутикулой. Устьица тетрацитного типа. Идиобласты, рафиды и стилоиды такие же, как в околоцветнике.

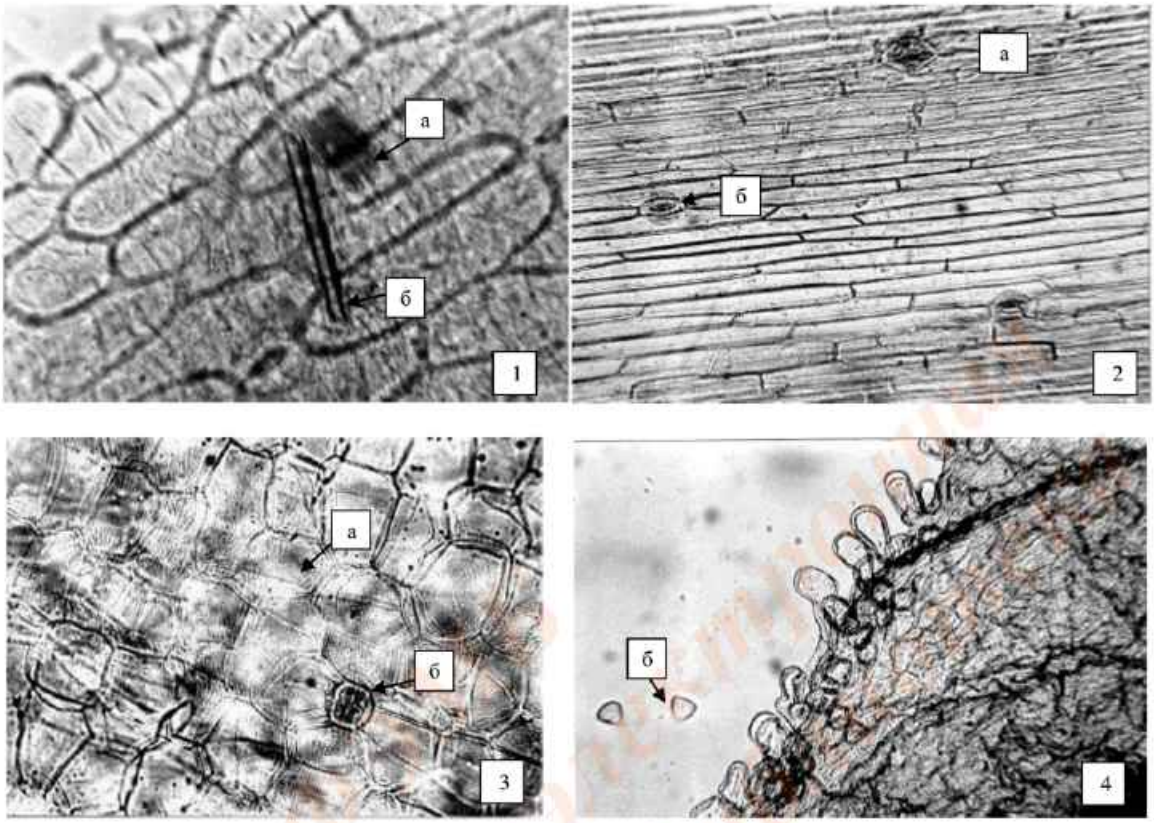


Рисунок – Ландыша листья, ландыша цветки.
1 – фрагмент листа с рафидами (а) и игольчатыми кристаллами (б) (250×); 2 – фрагмент эпидермиса цветоноса с рафидами (а) и устьицами тетрацитного типа (б) (125×); 3 – фрагмент верхнего эпидермиса лепестка со складчатой кутикулой (а) и устьицами тетрацитного типа (б) (200×); 4 – фрагмент лепестка с сосочковидными выростами (а) и пыльцой (б) (125×).

Определение основных групп биологически активных веществ

1. Тонкослойная хроматография

Ванилина раствора 1 % в хлорной кислоте растворе 10 % . 0,1 г ванилина растворяют в 10 мл хлорной кислоты раствора 10 %. Раствор используют свежеприготовленным.

Около 2,0 г листьев, травы или цветков ландыша, измельченных до величины частиц, проходящих через сито с отверстиями размером 1 мм, помещают в круглодонную колбу и прибавляют 60 мл спирта 70 %. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной

бане в течение 1 ч, после охлаждения извлечение фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. К шроту прибавляют 40 мл спирта 70 %, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин, после охлаждения раствор фильтруют в ту же мерную колбу, объем раствора доводят тем же спиртом до метки и перемешивают. 10 мл раствора упаривают на кипящей водяной бане приблизительно до 3 мл. Объем раствора доводят водой до 10 мл, прибавляют 1 мл свинца ацетата раствора 10 % и перемешивают (раствор А).

Полученный раствор А фильтруют в делительную воронку через бумажный фильтр, предварительно смоченный водой. Фильтр промывают 5 мл воды, прибавляют 30 мл смеси хлороформ – спирт 96 % (8:2) и извлекают в течение 5 мин. После разделения слоев хлороформный нижний слой фильтруют через бумажный фильтр, содержащий 3 г натрия сульфата безводного, смоченного 5 мл хлороформно-спиртовой смеси, в фарфоровую чашку. Операцию извлечения хлороформно-спиртовой смесью повторяют еще дважды, используя по 25 мл этой смеси. Хлороформное извлечение фильтруют через тот же фильтр в ту же фарфоровую чашку, фильтр промывают 10 мл хлороформно-спиртовой смеси (8:2). Объединенное хлороформное извлечение выпаривают на кипящей водяной бане досуха. Сухой остаток растворяют 2 мл спирта 70 % (раствор Б).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором на алюминиевой подложке размером 5×15 см наносят 50 мкл раствора Б. Пластинку с нанесенной пробой сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 1 ч смесью растворителей хлороформ – ацетон – метанол (6:2:2), 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. Пластинку обрабатывают ванилина раствором 1 % в хлорной кислоты растворе 10 % и выдерживают (в сушильном шкафу) при температуре 80 °С до четкого

обнаружения зон.

На хроматограмме раствора Б должны обнаруживаться не менее 3 зон адсорбции малинового цвета; допускается обнаружение других зон адсорбции.

2. К 3 мл элюата (см. раздел «Количественное определение»), приготовленного для количественного определения, прибавляют 2,5 мл нейтрального натрия пикрата раствора и 0,5 мл натрия гидроксида раствора 2 %, через 10 мин появляется оранжево-желтое окрашивание (гликозиды).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, трава, листья* – не более 14 %. *Цельное сырье, цветки* – не более 12 %. *Измельченное сырье, трава, листья* – не более 14 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье, трава* – частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 3 мм, – не более 3 %. *Цельное сырье, листья* – частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 3 мм, – не более 3 %. *Измельченное сырье, трава* – частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с размером отверстий 0,5 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье, листья* – частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм, – не более 5%; частиц, проходящих сквозь сито с размером отверстий 0,5 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Соцветия. *Цельное сырье, измельченное сырье. Трава* – не менее 5 %.

Сырье, изменившее окраску. *Цельное сырье. Трава, листья, цветки* – не более 5%. *Измельченное сырье. Трава, листья* – не более 5 %.

Отдельные цветоносы. *Цельное сырье. Цветки* – не более 1 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье. Трава, листья* – не более 1 %. *Цельное сырье. Цветки* – не более 0,5 %. *Измельченное сырье. Трава, листья* – не более 1 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье. Трава, листья* – не более 0,5 %.

Цельное сырье. Цветки – не более 0,3 %. *Измельченное сырье. Трава, листья* – 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, трава.* Биологическая активность 1 г должна быть не менее 110 ЛЕД и не более 120 ЛЕД. *Цельное сырье, листья*. Биологическая активность 1 г должна быть не менее 80 ЛЕД и не более 90 ЛЕД. *Цельное сырье, цветки*. Биологическая активность 1 г должна быть не менее 190 ЛЕД и не более 200 ЛЕД. *Измельченное сырье, трава.* Биологическая активность 1 г должна быть не менее 110 ЛЕД и не более 120 ЛЕД. *Измельченное сырье, листья*. Биологическая активность 1 г должна быть не менее 80 ЛЕД и не более 90 ЛЕД.

Биологическая активность. Активность цветков, травы и листьев ландыша определяют биологическим методом на лягушках по сравнению со стандартным образцом (СО) ландыша экстракта в соответствии с требованиями ОФС «Биологические методы оценки активности лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов, содержащих сердечные гликозиды».

Испытание на лягушках. Испытание проводят на травяных лягушках, вводя растворы в лимфатические бедренные мешки (под кожу) или в сердце (в полость желудочка), или на водяных лягушках, вводя раствор под кожу, в

полость желудочка или в вену. Стандартный и испытуемый образцы готовят в день опыта.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, и сушат в сушильном шкафу в течение 2 ч при температуре 40 – 60 °С; 5,0 г (точная навеска) высушенного сырья измельчают до размера частиц 1 мм и экстрагируют 110 мл спирта 96 % в аппарате Сокслета в течение 6 – 8 ч. Извлечение собирают в цилиндр вместимостью 100 мл и доводят объем спиртом 96 % до метки (1:20).

Для подкожного введения к 2 мл СО экстракта ландыша прибавляют 6 мл воды (1:4).

Спирто-водное извлечение (1:20) переводят в спирто-водное в соотношении 1:30 (листья), 1:40 (трава), 1:60 (цветки). Для этого 20 мл спирто-водного извлечения (1:20) выпаривают на кипящей водяной бане до 2 мл и доводят объем до 30 мл (листья); 40 мл (трава) и 60 мл (цветки) водой.

Образующуюся при этом муть или осадок не отфильтровывают, а прибавляют 1 – 2 капли натрия гидрокарбоната раствора 5 %. Полученное таким образом спирто-водное извлечение (1:20) испытывают на лягушках.

Определив наименьшие дозы стандартного и испытуемого образцов (в мл на массу травяной лягушки или в мл на 1 г массы водяной лягушки), вычисляют содержание ЛЕД в 1 г сырья.

Примечание. В случае завышенной биологической активности сырья (по числу ЛЕД) расчет количества лекарственного растительного сырья необходимого для производства лекарственного препарата следует проводить по формуле, приведенной в ОФС «Лекарственное растительное сырье. Фармацевтические субстанции растительного происхождения».

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».

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Лапчатки прямостоячей корневища	**ФС.2.5.0023.15**
Potentillae erectae rhizomata	**Взамен ФС 42-0294-07**

Собранные в фазу цветения (или осенью или весной до появления прикорневых листьев), очищенные от корней и отмытые от земли, высушенные корневища дикорастущего и культивируемого многолетнего травянистого растения лапчатки прямостоячей – *Potentilla erecta* L. *Raeusch.* – (*syn. Potentilla tormentilla Stokes.),* сем. розоцветных – *Rosaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Цельные или разрезанные на куски корневища длиной от 2 до 9 см, толщиной не менее 0,5 см, прямые или изогнутые, часто неопределенной формы (цилиндрические или почти шаровидные, комковатые); твердые, тяжелые, с ямчатыми следами от отрезанных корней и бугристыми рубцами от стеблей. Излом зернистый.

Цвет снаружи от красновато-коричневого до темно-коричневого (почти черного), цвет на изломе желтовато-коричневый, розовато-коричневый или коричневый. На поперечном разрезе под лупой виден слой пробки темно-коричневого цвета, светло-желтая кора и древесина, и сердцевина розоватого цвета. Запах слабый, ароматный. Вкус водного извлечения вяжущий.

Измельченное сырье. При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки корневищ неопределенной формы с бугристой наружной поверхностью и мелкозернистым изломом, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет от желтовато-коричневого, розовато-коричневого до темно-коричневого. Встречаются кусочки с остатками мелких корней и следами их

прикрепления; редко – кусочки тонких корней. Наружная поверхность от красновато-коричневого до темно-коричневого (почти черного) цвета; излом желтовато-, розовато- или темно-коричневого цвета. Запах слабый, ароматный. Вкус водного извлечения вяжущий.

Порошок. При рассмотрении порошка под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки корневищ неопределенной формы с зернистой поверхностью, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Цвет от красновато-коричневого до темно-коричневого с вкраплениями желтого, желтовато-коричневого или почти черного цвета. Изредка встречаются тонкие удлиненные кусочки желтого цвета (фрагменты волокнистых пучков) или кусочки темного цвета (наружная поверхность корневищ). Запах слабый, ароматный. Вкус водного извлечения вяжущий.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении поперечного среза корневища должно быть видно его непучковое строение. Покровная ткань – пробка, состоит из прямостенных таблитчато расположенных тонкостенных клеток темно-коричневого цвета. Под пробкой находится коровая паренхима, клетки которой округлые или слегка сдавлены в тангенальном направлении. Паренхима флоэмы представлена мелкими тонкостенными клетками. Механические ткани в коре отсутствуют. Линия камбия не всегда четко выражена. Древесина рассеяно сосудистого типа. Сосуды немногочисленные, широкие, в поперечном сечении округлые или радиально овальные, одиночные или в небольших радиальных группах по 2 – 3 (до 8). Сосуды прилегают к либриформу, образующему радиальные ряды. Волокна расположены прерывистыми радиальными полосками концентрическими кругами. Между радиальными рядами проводящей и механической ткани проходят широкие сердцевинные лучи из тонкостенной паренхимы. Сердцевина состоит из крупноклеточной тонкостенной паренхимы.

В коровой паренхиме, во флоэме, сердцевинных лучах и сердцевине содержатся включения в виде крахмальных зерен и друз оксалата кальция.

Иногда клетки полностью заполнены крахмальными зернами. Крахмальные зерна мелкие.

Измельченное сырье. При рассмотрении давленых препаратов должны быть видны: фрагменты пробки темно-коричневого цвета, состоящей из прямостенных таблитчатораспоженных тонкостенных клеток; фрагменты паренхимы, состоящие из округлых или слегка удлиненных тонкостенных клеток с друзами оксалата кальция и крахмальными зернами; фрагменты сосудов ксилемы различной толщины с лестничным и сетчатым типом вторичного утолщения клеточных стенок; группы толстостенных узкополосных пористых волокон или их фрагменты.

Порошок. При рассмотрении порошка видны: фрагменты пробки темно-коричневого цвета; фрагменты паренхимы, клетки которой содержат друзы оксалата кальция; отдельные друзы оксалата кальция; фрагменты паренхимы, клетки которой содержат крахмальные зерна; фрагменты сосудов ксилемы с лестничными и сетчатыми утолщениями клеточных стенок; фрагменты толстостенных узкополосных пористых волокон.

Определение основных групп биологически активных веществ

1. ***Тонкослойная хроматография***

Раствор стандартного образца (СО) галловой кислоты. Около 0,05 г СО галловой кислоты растворяют в спирте 96 % в мерной колбе вместимостью 50 мл, доводят объем раствора до метки спиртом 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около 0,5 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, помещают в круглодонную колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 5 мл спирта 50 %, нагревают на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 10 мин. После охлаждения до комнатной температуры полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр в колбу объемом 25 мл. Экстракцию

повторяют еще раз, извлечение фильтруют в ту же колбу объемом 25 мл (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля размером 10×10 см на полимерной подложке в виде полос длиной 10 мм, шириной не более 2 мм наносят 10 мкл испытуемого раствора и параллельно 2 мкл раствора СО галловой кислоты. Пластинку с нанесенными пробами, сушат при комнатной температуре в течение 5 мин, помещают в камеру предварительно насыщенную в течение не менее 40 мин со смесью растворителей этилацетат – толуол – муравьиная кислота безводная – вода (30:10:5:2) и хроматографируют восходящим способом.

Когда фронт подвижной фазы пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, пластинку вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей под тягой при комнатной температуре.

Затем хроматограмму обрабатывают железа(III) хлорида раствором 1 % в спирте 96 %, сушат под тягой при комнатной температуре в течение 3 - 5 мин и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме СО галловой кислоты должна обнаруживаться зона темно-синего цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должно обнаруживаться не менее двух зон коричневого или сине-коричневого цвета; допускается обнаружение других зон.

2. К 2 – 3 мл отвара корневищ лапчатки (1:10) прибавляют 4 – 5 капель железа(III) аммония сульфата 1 % раствора, должно наблюдаться зеленовато-черное окрашивание, постепенно переходящее в черно-синее (дубильные вещества).

Федеральная электронная медицинская библиотека

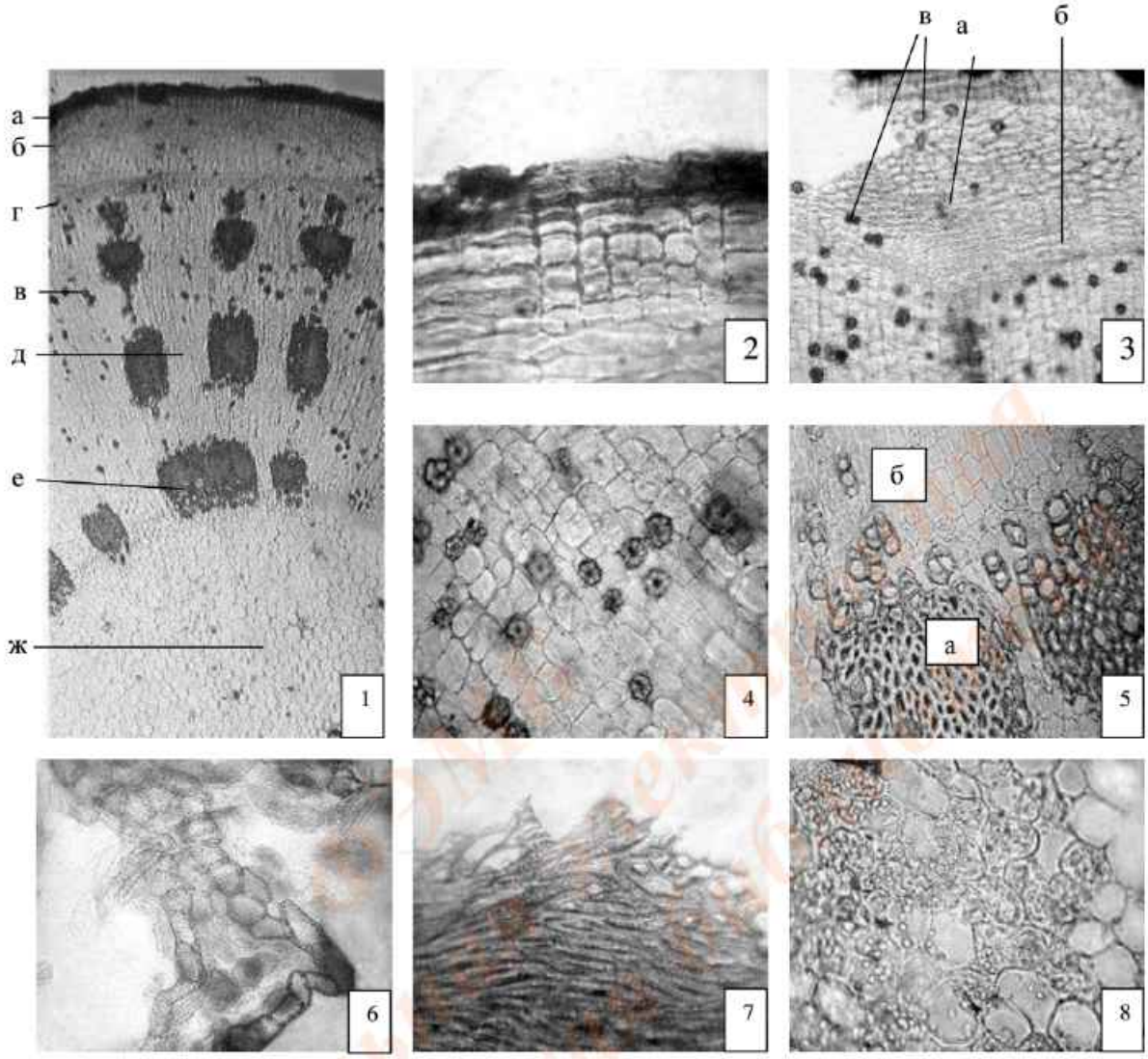


Рисунок – Лапчатки корневища.
1 – фрагмент поперечного среза лапчатки корневища: пробка (а), кора (б), друзы (в), камбий (г), сердцевинный луч (д), ксилема (е), клетки паренхимы сердцевины с крахмальными зернами (ж) (35×); 2 – фрагмент пробки (600×); 3 – фрагмент поперечного среза: флоэма (луб) (а), камбий (б), друзы оксалата кальция (в) (120×); 4 – клетки паренхимы коры с друзами оксалата кальция (300×); 5 – фрагмент поперченного среза: либриформ (а), сосуды ксилемы (б) (300×); 6 – обрывки сосудов ксилемы (300×); 7 – обрывки волокон (либриформ) (300×); 8 – клетки паренхимы с крахмальными зернами (300×).

ИСПЫТАНИЯ

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

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 5 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 3 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье:* 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 %.

Посторонние примеси

Корневища, потемневшие в изломе. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 5 %.

Кусочки корней, листьев, стеблей. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1 %.

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

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

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».

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

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

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок:* дубильные вещества в пересчете на танин – не менее 20 %.

Определение дубильных проводят веществ в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1).

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».

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Липы цветки	**ФС.2.5.0024.15**
Tiliae flores	**Взамен ГФ X ст. 274**
	Взамен ГФ XI ст. 12
	(изм. № 4 от 15.12.1999)

Собранные во время цветения и высушенные соцветия дикорастущих и культивируемых деревьев липы сердцевидной – *Tilia cordata Mill* и липы широколистной – *Tilia platyphyllos Scop*, сем. липовых – *Tiliaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Соцветия щитковидные, состоят из 5 – 15 (у липы сердцевидной) или 2 – 9 (у липы широколистной) цветков на удлиненных цветоножках, сидящих на общем цветоносе, сросшемся в нижней части с главной жилкой прицветного листа. Цветки правильные, 1 – 1,5 см в диаметре. Чашечка из 5 продолговато-яйцевидных чашелистиков, густо опушенных по краю и с внутренней стороны. Венчик из 5 свободных яйцевидных лепестков, длиннее чашечки. Тычинки многочисленные, с 2 желтыми пыльниками на длинных нитях, сросшихся в 5 пучков. Пестик один с верхней шаровидной завязью, густо покрытой пушистыми волосками. Встречаются цветочные бутоны и незрелые плоды – шаровидные сильно опушенные орешки до 2 мм в диаметре. Прицветный лист пленчатый, с густой сетью жилок, длиной до 6 см и шириной до 1,5 см, продолговато-эллиптической формы с притупленной верхушкой, в нижней половине сросшийся по главной жилке с цветоносом. Цвет лепестков беловато-желтый, чашелистиков зеленовато- или желтовато-серый, прицветных листьев светло-желтый или зеленовато-желтый. Запах слабый, ароматный.

Вкус водного извлечения сладковатый, слегка вяжущий, с ощущением слизистости.

Измельченное сырье. Смесь цветков, цветоножек и кусочков прицветников различной формы, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.

При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки слегка опушенных прицветных листьев светло-желтого, зеленовато-желтого или светло-зеленого цвета; чашелистики или их части, густо опушенные (с внутренней стороны и по краю), желто-серого, зеленовато-серого, реже светло-коричневого цвета; лепестки яйцевидной формы бело-желтого цвета; тычинки, пестик или их части, опушенные, светло-желтого цвета; кусочки цветоножек и цветоносов, опушенные, светло-зеленого, зеленого или серо-зеленого цвета; отдельные цветочные бутоны и незрелые сильноопушенные плоды (орешки) светло-зеленого или серо-зеленого цвета.

Цвет измельченного сырья лепестков беловато-желтый, чашелистиков зеленовато- или желтовато-серый, светло-коричневый, прицветных листьев – светло-желтый или зеленовато-желтый, светло-зеленый. Запах слабый, ароматный. Вкус водного извлечения сладковатый, слегка вяжущий, с ощущением слизистости.

Порошок. Смесь частиц цветков, цветоножек и прицветников липы различной формы, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

При рассмотрении порошка под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны: кусочки слегка опушенных прицветных листьев зеленого, светло-зеленого или зелено-желтого цвета; чашелистики или их части, густо опушенные (с внутренней стороны и по краю), желто-серого, зеленовато-серого, реже светло-коричневого цвета; лепестки яйцевидной формы бело-желтого цвета; тычинки, пестик или их части, опушенные, светло-желтого цвета; кусочки цветоножек и цветоносов, опушенные, светло-зеленого, зеленого или серо-зеленого цвета; отдельные цветочные бутоны и незрелые

сильноопушенные плоды (орешки) светло-зеленого или серо-зеленого цвета.

Цвет порошка серовато-зеленый, серовато-желтый или светло-коричневый с желтыми, темно-желтыми, коричневыми и темно-коричневыми вкраплениями. Запах слабый, ароматный. Вкус водного извлечения сладковатый, слегка вяжущий, с ощущением слизистости.

Микроскопические признаки. *Цельное и измельченное сырье.* При рассмотрении прицветного листа с поверхности с обеих сторон листа видны сильноизвилистые стенки клеток эпидермиса. Кутикула продольно-морщинистая с обеих сторон. Морщинистость очень сильно выраженная. Устьица только на нижней стороне, овальные, с 4 – 6 околоустьичными клетками (аномоцитный тип). Жилки сопровождаются вытянутыми клетками с утолщенными слабоизвилистыми стенками. Вдоль жилок пролегают секреторные ходы, наполненные розовым содержимым. Волоски встречаются преимущественно в средней части прицветного листа, вблизи места срастания его с цветоносом. Волоски 2 типов: головчатые – с многоклеточной овальной головкой на короткой 1–3-клеточной ножке и звездчатые, состоящие из 3 – 7 длинных извилистых клеток, сросшихся основаниями. Мезофилл очень рыхлый, типа аэренхимы, с друзами, реже с призматическими кристаллами оксалата кальция, особенно многочисленными вблизи жилок.

Клетки эпидермиса лепестка прямоугольной формы с прямыми или слабоизвилистыми стенками. Наблюдаются клетки со слизью. Кутикула с верхней стороны слабо выражено штриховатая. В мезофилле располагаются друзы оксалата кальция. Волоски такие же, как на прицветном листе, присутствуют вильчатые волоски, состоящие из 2 извилистых клеток, сросшихся основаниями. Простые волоски встречаются редко с нижней стороны лепестка и по краю лепестка. На верхушке лепестка цветка клетки эпидермиса образуют сосочковидные выросты.

Клетки эпидермиса чашелистика многоугольные с прямыми и слабоизвилистыми стенками. Кутикула продольно-морщинистая. Устьица на

верхней стороне аномоцитного типа. Волоски такие же, как на прицветном листе и, кроме того, у основания чашелистиков с верхней стороны располагаются длинные прямые параллельные волоски, состоящие из 2 параллельных клеток, сросшихся основаниями. В мезофилле располагаются друзы оксалата кальция. На поперечном срезе чашелистика видны крупные полости слизистых клеток.

Пыльца округло-угловатая, гладкая, сплющенная с 3 щелевидными отверстиями.

Эпидермис цветоножки состоит из клеток прямоугольной формы с прямыми стенками без устьиц. В паренхиме содержатся друзы оксалата кальция. Проводящие пучки сопровождаются клетками-идиобластами с коричнево-оранжевым содержимым, механическими волокнами и пористыми толстостенными клетками.

Тычинки и пестик содержат друзы. Пестик опушен волосками, сидящими пучками и выходящими по 2 – 10 из общего основания. Волоски извилистые тонкостенные.

Порошок. Микропрепараты порошка под микроскопом представляют собой смесь различных частиц: фрагментов эпидермиса прицветного листа, состоящего из клеток с извилистыми стенками; продольно-морщинистой кутикулы; овальных устьиц аномоцитного типа (и без них); головчатых волосков, состоящих из многоклеточной овальной головки на короткой 1–3-клеточной ножке (и без них); звездчато-лучистых волосков, состоящих из 3 – 8 извилистых клеток, сросшихся основаниями (и без них); мезофилл листа очень рыхлый, типа аэренхимы, содержит друзы оксалата кальция, реже призматические кристаллы оксалата кальция, особенно многочисленные вблизи жилок; фрагментов лепестка с клетками эпидермиса прямоугольной формы с прямыми или слабоизвилистыми стенками, с вильчатыми волосками, состоящими из 2 извилистых клеток, сросшихся у основания (и без них), с просвечивающимися друзами в мезофилле; фрагментов чашелистика с многоугольными клетками эпидермиса с прямыми или

извилистыми стенками, продольно-морщинистой кутикулой, с овальными устьицами аномоцитного типа (и без них), со звездчато-лучистыми волосками, состоящими из 3 – 8 извилистых клеток, сросшихся основаниями, с вильчатыми волосками, состоящими из 2 извилистых клеток, сросшихся у основания (и без них), с длинными прямыми параллельными волосками, состоящими из 2 параллельных клеток, сросшихся основаниями (и без них); фрагментов цветоножки с эпидермисом, представленным клетками прямоугольной формы с прямыми стенками, с просвечивающимися в паренхиме друзами оксалата кальция, со звездчато-лучистыми волосками, состоящими из 3 – 8 извилистых клеток, сросшихся основаниями (и без них), с головчатыми волосками, состоящими из многоклеточной овальной головки на короткой 1–3-клеточной ножке (и без них); фрагментов тычинок, содержащих друзы в паренхиме; фрагментов пестика, содержащих друзы в паренхиме и имеющих на поверхности извилистые тонкостенные волоски, сидящие пучками и выходящие по 2 – 10 из общего основания; пыльцы округло-угловатой гладкой сплющенной с 3 щелевыми отверстиями.

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

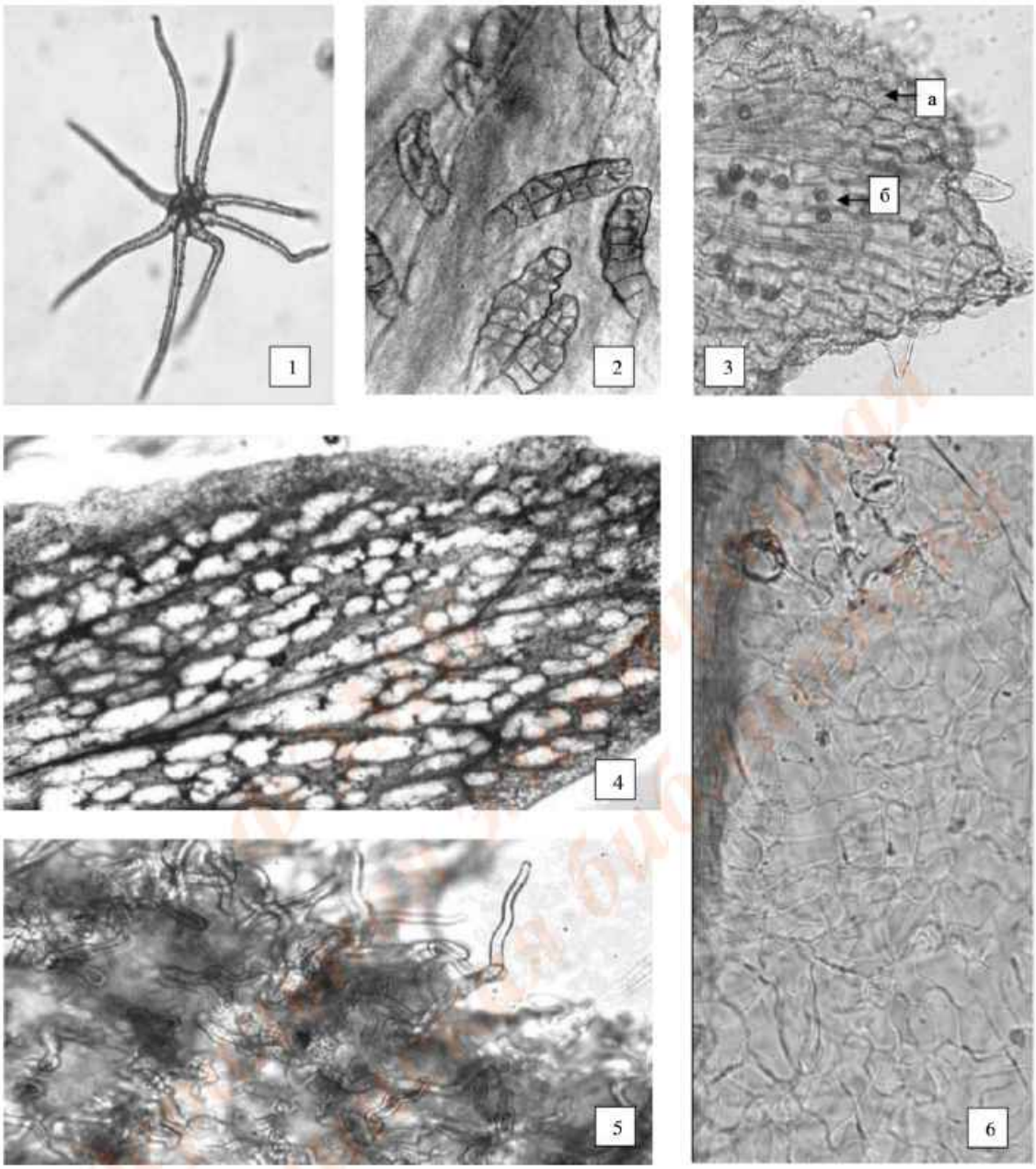


Рисунок – Липы цветки.
1 – звездчато-лучистый волосок (200×); 2 – головчатые волоски (200×); 3 – фрагмент верхушки лепестка цветка: а – сосочковидные клетки эпидермиса, б – друзы оксалата кальция (200×); 4 – фрагмент лепестка с идиобластами со слизью (40×); 5 – вильчатые волоски (200×); 6 – аэренхима (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

1. ***Тонкослойная хроматография***

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) рутина. Около 0,005 г рутина (рутина тригидрата) растворяют в 10 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в хорошо укупоренной упаковке, в прохладном защищенном от света месте.

Раствор СО кофейной кислоты. Около 0,002 г кофейной кислоты растворяют в 10 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном защищенном от света месте.

Дифенилборилоксиэтиламина раствор 1 % в спирте 96 %. 1,0 г дифенилборилоксиэтиламина (дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира) растворяют в 100 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Полиэтиленгликоля раствор 5 % в спирте 96 %. 5 мл (ПЭГ) 400 смешивают со 100 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 6 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около 1,0 г, сырь измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл спирта 96 % и нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 15 мин. После охлаждения содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля на алюминиевой подложке размером 10×10 см наносят длиной 10 мм, шириной не более 3 мм последовательно в одну полоску 10 мкл раствора СО рутина и 10 мкл раствора СО кофейной кислоты, в другую полосу 10 мкл испытуемого раствора. Пластинку сушат при комнатной температуре в течение 10 мин, помещают в камеру, выложенную изнутри фильтровальной бумагой и предварительно насыщенную не менее 30 мин смесью растворителей этилацетат – толуол – муравьиная кислота безводная – вода (60:14:10:8) и хроматографируют восходящим способом.

Когда фронт растворителей пройдет около 80 - 90% от длины пластинки, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей под тягой при комнатной температуре.

Затем пластинку нагревают при 100 - 105 °С в течение 5 - 10 мин и теплую обрабатывают последовательно дифенилборилоксиэтиламина

раствором 1 % в спирте 96 % и полиэтиленгликоля раствором 5 % в спирте 96 %. Через 15 мин после обработки пластинку просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме растворов СО рутина и СО кофейной кислоты должна обнаруживаться зона желтого или оранжево-желтого цвета (рутин) и зона голубого цвета (кофейная кислота).

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться следующие зоны: 2 зоны желтого или желто-оранжевого цвета на уровне зоны СО рутина; зона синего или фиолетово-синего цвета на уровне зоны СО кофейной кислоты; допускается обнаружение других зон.

2. К 10 мл настоя цветков липы (1:20) прибавляют 30 мл спирта 96 % и перемешивают, появляется хлопьевидные сгустки, выпадающие в осадок при стоянии (полисахариды).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье*, *измельченное сырье*, *порошок* – не более 13 %.

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

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье*, *измельченное сырье, порошок* – не более 3 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* измельченных частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, – не более 3 %. *Измельченное сырье*: измельченных частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; измельченных частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 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

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Соцветия с прицветниками и отдельные прицветники, поврежденные вредителями и пораженные ржавчиной. *Цельное сырье* – не более 2 %.

Изменившие окраску части соцветия (потемневшие и почерневшие) *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 4 %.

Другие части липы (листья и побеги). *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1%.

Соцветия, полностью отцветшие, с плодами. *Цельное сырье* – не более 2 %.

Осыпь отдельных цветков или соцветий без прицветников. *Цельное сырье* – не более 15 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 0,3 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 0,1 %.

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:* сумма восстанавливающих сахаров (в составе полисахаридов) в пересчете на глюкозу – не менее 2 %.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Приготовление растворов.

Натрия гидроксида раствор 40 %. 40,0 г натрия гидроксида растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 100 мл, после охлаждения доводят объем раствора водой до метки, перемешивают. Раствору дают отстояться и прозрачную жидкость сливают с осадка. Срок годности раствора 6 мес при хранении в стеклянном сосуде с резиновой пробкой.

Натрия карбоната раствор 20 %. 20,0 г натрия карбоната безводного растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают. Срок годности раствора 2 мес.

Раствор СО глюкозы. Около 0,05 г (точная навеска) СО глюкозы (в пересчете на безводную) растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 250 мл, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают. Срок годности раствора 10 сут.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в круглодонную колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 60 мл спирта 75 %, 0,3 г кальция карбоната и нагревают на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 45 мин. Охлаждают и фильтруют в мерную колбу вместимостью 100 мл через бумажный фильтр, следя за тем, чтобы частицы сырья остались в круглодонной колбе. В круглодонную колбу прибавляют 30 мл спирта 75 % и проводят повторное извлечение флавоноидов при нагревании на кипящей водяной бане в течение 15 мин. Извлечение охлаждают и фильтруют через тот же фильтр в ту же мерную колбу вместимостью 100 мл, аккуратно сливают, следя за тем, чтобы частицы сырья остались в круглодонной колбе. Сырье и фильтр промывают 10 мл спирта 75 %, доводят объем раствора спиртом 75 % до метки и перемешивают (раствор А).

В круглодонную колбу с сырьем приливают 45 мл воды и нагревают на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 60 мин, горячее извлечение фильтруют через стеклянный фильтр ПОР 16 диаметром 25 мм под вакуумом. Сырье на стеклянном фильтре и круглодонную колбу промывают 5 мл воды. Извлечение количественно переносят в мерную колбу

вместимостью 50 мл, доводят объем раствора в колбе водой до метки и перемешивают (раствор Б).

20,0 мл раствора Б помещают в круглодонную колбу, прибавляют 7 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и кипятят с обратным холодильником в течение 10 мин. К полученному извлечению прибавляют по каплям 6 мл натрия гидроксида раствора 40 %, если раствор щелочной, то по каплям прибавляют раствор хлористоводородной кислоты разведенной до pH 4,0 – 4,5. Полученный раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают. Фильтруют извлечение через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10 – 15 мл фильтрата (раствор В).

10,0 мл раствора В помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 0,5 мл свинца ацетата раствора 10 %, перемешивают. Через 5 мин прибавляют 1,5 мл натрия фосфата раствора 5 %, перемешивают, оставляют на 2 мин, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают, фильтруют через бумажный фильтр, отбрасывая первые 5 – 10 мл фильтрата (раствор Г).

В 4 конические колбы вместимостью 50 мл помещают по 2,5 мл пикриновой кислоты раствора 1 %, затем по 7,5 мл натрия карбоната раствора 20 %. В первую колбу прибавляют 5,0 мл раствора В (испытуемый раствор), во вторую – 5,0 мл раствора Г (раствор сравнения 1), в третью – 5,0 мл раствора СО глюкозы (раствор СО глюкозы), в четвертую – 5,0 мл воды (раствор сравнения 2). Колбы с содержимым погружают на 10 мин в кипящую водяную баню, затем охлаждают до комнатной температуры и содержимое количественно переносят в мерные колбы вместимостью 25 мл, доводят объем растворов в колбах водой до меток, перемешивают.

Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора и раствора СО глюкозы на спектрофотометре при длине волны 470 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно растворов сравнения 1 и 2 соответственно.

Содержание суммы восстанавливающих сахаров (в составе

полисахаридов) в пересчете на глюкозу в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 5 \cdot 50 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100 \cdot P}{A_0 \cdot 250 \cdot 25 \cdot a \cdot 20 \cdot 5 \cdot (100 - W) \cdot 100} = \frac{A \cdot a_0 \cdot 5000 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W) \cdot 100},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;
A_0 – оптическая плотность раствора СО глюкозы;
a – навеска сырья, г;
a_o – навеска СО глюкозы в пересчете на безводную глюкозу, г;
P – содержание основного вещества в СО глюкозы, %;
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».

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Лопуха корни	**ФС.2.5.0025.15**
Arctii radices	**Взамен ФС 42-0143-05**

Собранные осенью или ранней весной, очищенные от остатков стеблей, листьев, тонких корней, отмытые от земли, разрезанные на куски и высушенные корни двулетних травянистых растений лопуха большого – *Arctium lappa* L., лопуха паутинистого (войлочного) – *Arctium tomentosum Mill.*, лопуха малого – *Arctium minus* (*Mill.*) *Bernh.*, сем. астровых – *Asteraceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Цельные или разрезанные на куски корни, длиной 20 – 40 см (у лопуха большого и лопуха паутинистого) и 10 – 30 см (у лопуха малого), толщиной 2,0 – 3,5 см (у лопуха большого и лопуха паутинистого) и 1,5 – 2,5 см (у лопуха малого). Корни глубоко морщинистые, конусовидной формы, иногда спирально перекрученные. Излом неровный. Цвет снаружи темно-коричневый, на изломе желтовато-серый. На поперечном разрезе под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видна небольшая светлая кора, темная линия камбия и широкая желтоватая древесина пористо-лучевого строения. Запах слабый, своеобразный. Вкус водного извлечения горьковатый.

Измельченное сырье. При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.

Цвет желтовато-серый, иногда с частично сохранившейся морщинистой пробкой коричневого или темно-коричневого цвета. Запах

слабый, своеобразный. Вкус водного извлечения горьковатый.

Порошок. При рассмотрении порошка под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки корней, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. При рассмотрении сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны бесформенные кусочки корней желтовато-серого цвета, иногда с частично сохранившейся морщинистой пробкой коричневого или темно-коричневого цвета.

Цвет порошка от желтовато-серого до темно-коричневого. Запах слабый, своеобразный. Вкус водного извлечения горьковатый.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* На поперечном срезе корня видна покровная ткань – пробка, представленная 2 — 3 рядами клеток темно-коричневого цвета. Клетки паренхимы коры крупные, тангентально-вытянутые со слегка утолщенными оболочками. Среди них хорошо виден ровный ряд клеток, иногда со светлым содержимым, окрашивающимся суданом III в оранжевый цвет. В ряду этих клеток встречаются секреторные образования (ходы) округлой или овальной формы с коричневым содержимым. Клетки паренхимы внутренней части коры округлые; у более крупных корней паренхима коры рыхлая. Проводящие элементы луба образуют небольшие участки конусовидной формы, разделенные сердцевинными лучами. Лубяные волокна многочисленные, с утолщенными стенками и широкой полостью, расположены большими и малыми группами или диффузно среди элементов флоэмы. Линия камбия четкая, состоит из нескольких рядов клеток. В древесине видны одиночные или радиально расположенные группы пористых и сетчатых широкополосных сосудов, окруженных трахеидами, отдельные группы трахеид; клетки паренхимы мелкие. Встречаются сосуды, заполненные коричневым содержимым. Сердцевинные лучи одно- или многорядные, клетки их округлые. Паренхимные клетки внутренней части коры, древесины и сердцевинных лучей содержат глыбки инулина (препарат без нагревания). Иногда паренхима древесины разрушена по сердцевинным лучам и имеет узкие

радиально вытянутые полости, доходящие до линии камбия.

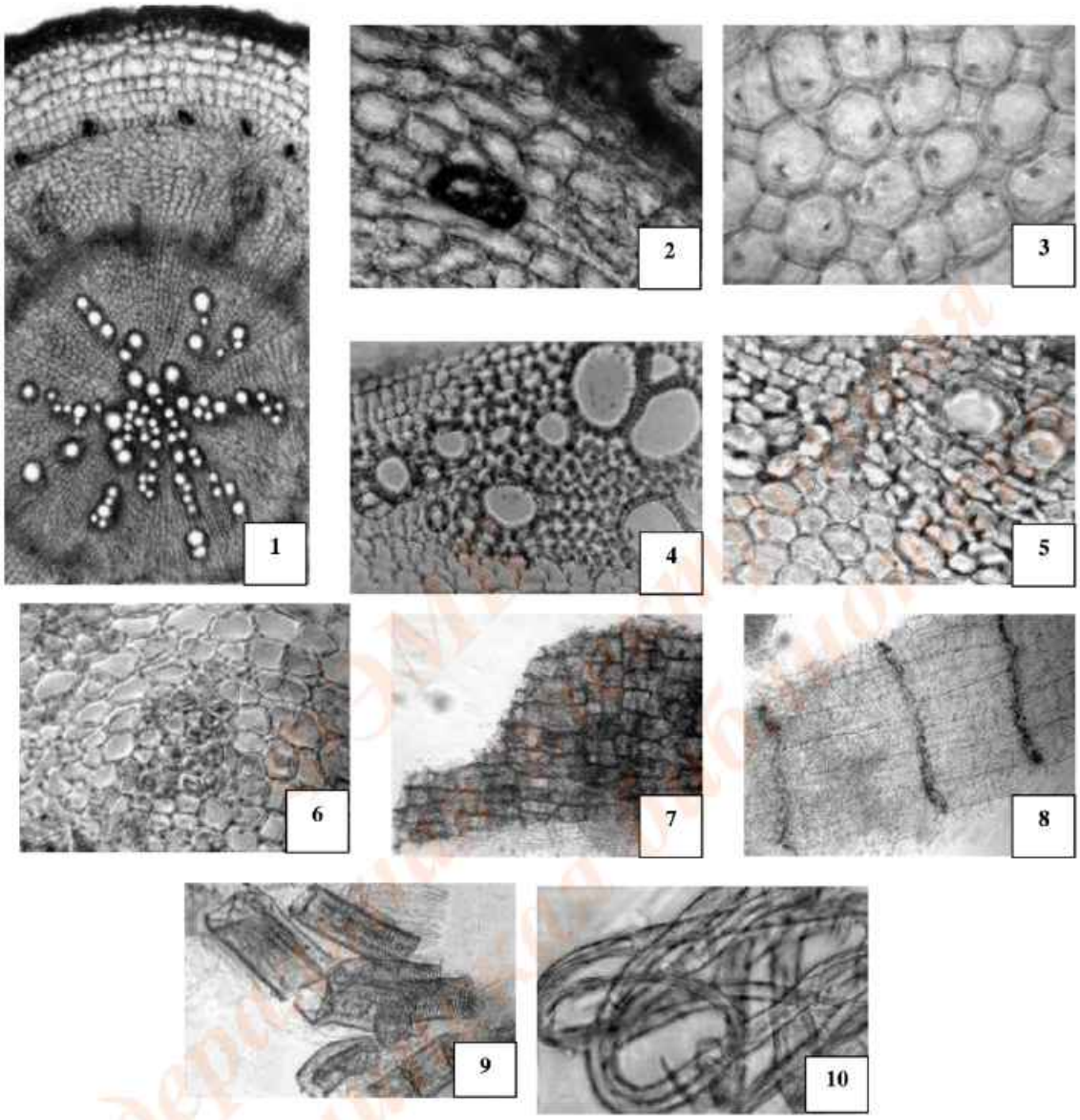


Рисунок – Лопуха корни.
1 – фрагмент поперечного среза (60×); 2 – фрагмент поперечного среза: клетки пробки, секреторный ход с коричневым содержимым, клетки паренхимы коры (200×); 3 – клетки паренхимы коры с глыбками инулина (300×); 4 – сосуды и трахеиды ксилемы, сердцевинные лучи (200×); 5 – сосуды ксилемы, клетки камбия, сердцевинный луч, клетки флоэмы (200×); 6 – волокна флоэмы (200×); 7 – 10 – фрагменты давленого препарата: 7 – клетки пробки (120×), 8 – секреторные ходы с коричневым содержимым в паренхиме коры (120×), 9 – проводящие элементы ксилемы (сосуды и трахеиды) (200×), 10 – лубяные волокна (200×).

Измельченное сырье. При рассмотрении «давленых» препаратов должны быть видны фрагменты пробки темно-коричневого цвета, фрагменты паренхимы коры с секреторными образованиями (ходами) с коричневым содержимым; фрагменты паренхимы с глыбками инулина; группы лубяных волокон с утолщенными стенками или их фрагменты; фрагменты пористых и сетчатых широкополосных сосудов и трахеид.

Порошок. При рассмотрении микропрепарата порошка должны быть видны фрагменты пробки темно-коричневого цвета, фрагменты паренхимы с глыбками инулина, фрагменты лубяных волокон с утолщенными стенками, фрагменты пористых и сетчатых широкополосных сосудов.

Определение основных групп биологически активных веществ

1. ***Тонкослойная хроматография***

Раствор стандартного образца (СО) фруктозы. Около 0,1 г фруктозы помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 85 мл воды, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Срок годности раствора 10 сут при хранении в хорошо укупоренной упаковке, в прохладном защищенном от света месте.

Около 0,1 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещают в колбу со шлифом вместимостью 50 мл и прибавляют 10 мл воды. Колбу присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на плитке в течение 1 ч, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Затем колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры и фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля на полимерной подложке размером 10 × 15 см наносят 10 мкл испытуемого раствора, рядом – 5 мкл раствора СО фруктозы. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин смесью растворителей *н*-бутанол – уксусная кислота – эфир – вода (9:6:3:1), и хроматографируют

восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают и сушат до удаления следов растворителей. Пластинку последовательно обрабатывают тимола раствором спиртовым 20 %, затем серной кислотой разведенной 16 % и выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100 – 105 ºС в течение 3 мин.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться 2 зоны адсорбции оранжево-красного цвета, одна из которых на уровне зоны на хроматограмме раствора СО фруктозы, другая – ниже; допускается обнаружение 3 – 5 других зон адсорбции оранжево-красного цвета (сахара).

2. При нанесении на поперечный срез корня лопуха (л.) большого, л. малого или л. пятнистого, на соскоб частиц измельченных корней или порошок 2 – 3 капель тимола раствора спиртового 20 % и 1 капли серной кислоты концентрированной должно наблюдаться оранжево-красное окрашивание (инулин).

ИСПЫТАНИЯ

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

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 11 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 4,5 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье:* 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 %.

Посторонние примеси

Корни, потемневшие на изломе. *Цельное сырье, измельченное сырье* –

Республиканская электронная библиотека ФЭМБ

не более 5 %.

Остатки стеблей, в том числе отделенные при анализе, и другие части. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 5 %.

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

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

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:* сумма полисахаридов в пересчете на фруктозу – не менее 8 %; экстрактивных веществ, извлекаемых водой, – не менее 35 %.

Полисахариды

Приготовление растворов.

Хлористоводородной кислоты раствор 30 %. Смешивают хлористоводородную кислоту концентрированную с водой в соотношении (5:1).

Резорцина раствор спиртовой 0,1 %. 0,1 г резорцина растворяют в 70 мл спирта 96 % в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем спиртом 96 % до метки и перемешивают. Срок годности раствора не более 10 сут при хранении в прохладном и защищенном от света месте.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г (точная

навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 60 мл воды и нагревают на плитке в течение 30 мин. Полученное извлечение охлаждают до комнатной температуры и фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 200 мл, избегая попадания сырья на фильтр. Экстракцию повторяют еще дважды, каждый раз используя по 30 мл воды: первый раз в течение 30 мин, а второй – в течение 15 мин.

Сырье переносят на бумажный фильтр, промывают колбу, а затем промывают остаток на фильтре, используя каждый раз по 10 мл воды. К полученному извлечению прибавляют 2 мл свинца ацетата раствора 10 %, перемешивают и оставляют на 10 мин. Затем прибавляют 2 мл натрия фосфорнокислого двузамещенного раствора 5 %, перемешивают и оставляют на 5 мин. Затем доводят объем раствора водой до метки и перемешивают Раствор фильтруют через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10 – 15 мл фильтрата (раствор А).

5,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (раствор Б).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 5 мл резорцина раствора спиртового 0,1 %, прибавляют 5,0 мл раствора Б, доводят объем хлористоводородной кислоты раствором 30 % до метки и перемешивают (раствор В).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 5 мл резорцина раствора спиртового 0,1 %, прибавляют 5 мл воды, доводят объем хлористоводородной кислоты раствором 30 % до метки и перемешивают (раствор сравнения).

Колбы с раствором сравнения и раствором В нагревают на водяной бане при температуре 80 °С в течение 20 мин, охлаждают, доводят объем извлечений в колбах тем же растворителем до метки.

Оптическую плотность раствора В измеряют на спектрофотометре при длине волны 482 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора

сравнения.

Содержание суммы полисахаридов в пересчете на фруктозу вычисляют с использованием удельного показателя поглощения продуктов реакции фруктозы с резорцином в кислой среде, в абсолютно сухом сырье в процентах (X) по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 200 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 5 \cdot 5 \cdot (100 - W)},$$

где A_o – оптическая плотность раствора В;

$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения продуктов реакции фруктозы с резорцином в кислой среде при длине волны 482 нм, равный 298;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Экстрактивные вещества. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1, экстрагент – вода).

Примечание. Определение суммы полисахаридов в пересчете на фруктозу и экстрактивных веществ, извлекаемых водой, проводят для сырья, предназначенного для производства лекарственных растительных препаратов (пачки, фильтр-пакеты).

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».

Федеральный ЭМБ
медицинская библиотека

Льна посевного семена	**ФС.2.5.0026.15**
Lini usitatissimi semina	**Взамен ГФ XI ст. 79**

Собранные в период плодоношения зрелые и высушенные семена культивируемого травянистого растения льна посевного (обыкновенного) – *Linum usitatissimum* L., сем. льновых – *Linaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Семена сплюснутые, яйцевидной формы, заостренные с одного конца и округлые с другого, неравнобокие, длиной до 6 мм, шириной до 3 мм. Поверхность семян гладкая, блестящая, со светло-желтым, ясно заметным семенным рубчиком (под лупой 10× или стереомикроскопом 16×). Цвет семян от светло-желтого до темно-коричневого. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения слизисто-маслянистый.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении поперечного среза семени должны быть видны: кожура в виде темно-коричневой полосы, эндосперм и зародыш. При большом увеличении ясно различаются слои семенной кожуры. Эпидермис состоит из крупных, четырехугольных клеток, покрытых толстым слоем кутикулы, содержащих слизь; боковые (радиальные) стенки клеток слегка извилистые, при разбухании слизи способны выпрямляться и вытягиваться. Под эпидермисом располагается 1 – 2 ряда рыхлых паренхимных клеток почти округлой формы. Третий слой представлен механической тканью, состоящей из одного ряда сильно утолщенных, одревесневших желтых клеток, пронизанных поровыми канальцами.

Федеральный электронный медицинский библиотека

Под механической тканью расположены узкие тонкостенные клетки «поперечного слоя» (вытянуты поперек семени). Самый внутренний слой кожуры – пигментный – состоит из одного ряда четырехугольных клеток с заметно утолщенными пористыми оболочками и темно-желтым содержимым. Эндосперм состоит из многоугольных клеток, которые содержат алейроновые зерна, включающие кристаллоиды, глобоиды, и капли жирного масла (реакция с суданом III). Ткань семядолей отличается более мелкими клетками.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

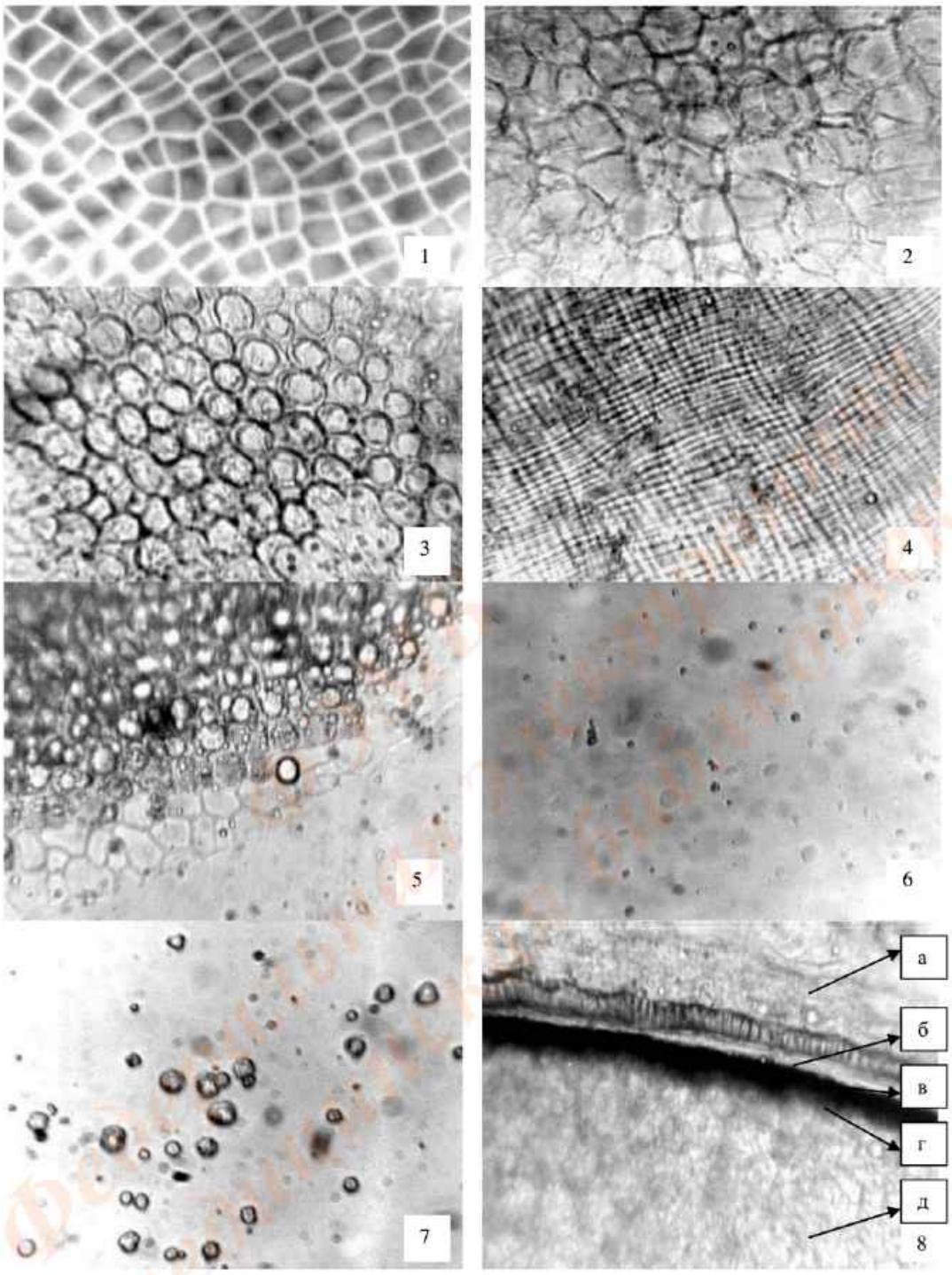


Рисунок – Льна посевного семена.
1 –эпидермис (250×); 2 – паренхима (250×); 3 – механическая ткань (250×); 4 – поперечный слой (250×); 5 – эндосперм (250×); 6 – капли жирного масла и алейроновые зерна (250×); 7 – алейроновые зерна с кристаллоидами и глобоидами (500×); 8 – поперечный срез семени льна (250×): а – паренхимный слой кожуры, б – механический слой, в – клетки поперечного слоя, г – пигментный слой, д – эндосперм семени.

Определение основных групп биологически активных веществ

Семена льна измельчают до отсутствия цельных семян и помещают на предметное стекло в каплю туши (разведенную водой 1:10), тщательно размешивают и накрывают покровным стеклом. На темно-сером (почти черном) фоне выделяются белыми пятнами клетки со слизью.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье* - не более 13 %.

Зола общая. *Цельное сырье* - не более 6 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье* - не более 0,5 %.

Посторонние примеси

Другие части растения (части коробочек, плодоножек, битых семян). *Цельное сырье* - не более 1 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье* - не более 2 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье* - 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:* сумма полисахаридов - не менее 7 %.

Аналитическую пробу измельчают до величины частиц, проходящих

Федеральная электронная медицинская библиотека

сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Около 10,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 500 мл, прибавляют 200 мл воды, колбу присоединяют к обратному холодильнику и кипятят при перемешивании на электрической плитке в течение 30 мин. Экстракцию водой повторяют еще 2 раза: первый раз 200 мл воды, второй раз 100 мл воды. Водные извлечения объединяют, охлаждают до комнатной температуры, фильтруют в мерную колбу вместимостью 500 мл через 5 слоев марли, вложенной в стеклянную воронку диаметром 66 мм и предварительно смоченной водой. Фильтр промывают водой, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (раствор А).

25,0 мл раствора А помещают в стакан вместимостью 200 мл, прибавляют 100 мл спирта 96 %, перемешивают, подогревают на водяной бане при температуре 60 °С в течение 5 мин. Через 1 ч содержимое стакана переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют со скоростью 5000 об/мин в течение 30 мин. Надосадочную жидкость фильтруют под вакуумом при остаточном давлении 13 - 16 кПа через высушенный до постоянной массы при температуре 100 - 105 °С стеклянный фильтр ПОР 16 диаметром 40 мм. Затем осадок количественно переносят на тот же фильтр и промывают 20 мл этилацетата. Фильтр с осадком сушат сначала на воздухе, затем при температуре 100 - 105 °С до постоянной массы.

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

$$X = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 500 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot 25 \cdot (100 - W)},$$

где m_1 – масса фильтра, г;
m_2 – масса фильтра с осадком, г;
a – навеска сырья, г;
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».

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Мать-и-мачехи обыкновенной листья	**ФС.2.5.0027.15**
Tussilaginis farfarae folia	**Взамен ГФ XI ст. 16**

Собранные в первой половине лета и высушенные листья дикорастущего многолетнего травянистого растения мать-и-мачехи обыкновенной – *Tussilago farfara* L., сем. астровых – *Asteraceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье*. Листья цельные или частично измельченные, простые, черешковые, длина листовой пластинки до 15 см, ширина до 10 см; округло- или широкояйцевидные, с острой верхушкой и сердцевидным основанием; край неравномерно выемчато-зубчатый; сверху голые, снизу плотно и мягко беловойлочные. Листья не должны быть слишком молодыми, не должны иметь густого опушения на верхней стороне листовой пластинки.

При рассмотрении сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видно, что верхняя сторона листовой пластинки голая, местами на жилках расположены длинные тонкие спутанные волоски; нижняя сторона листа беловойлочная от обилия спутанных длинных волосков. Черешки листьев длиной до 5 см, тонкие, округлые или полукруглые в сечении, ребристые, сверху желобоватые с войлочным опушением. Цвет листьев с верхней стороны зеленый или желтовато-зеленый, иногда с коричневато-фиолетовыми или фиолетовыми пятнами, с нижней стороны – беловато-серый или зеленовато-серый; черешков – коричневато-зеленый, желтовато-коричневый или фиолетово-зеленый. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения слабо-горьковатый с ощущением слизистости.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Измельченное сырье. Кусочки листьев различной формы, проходящие сквозь сито с размером отверстий 7 мм.

При рассмотрении листьев под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки листьев, иногда с редкозубчатым краем и почти черными кончиками зубцов, голых и зеленых или желтовато-зеленых с извилисто-морщинистой поверхностью, иногда с коричневато-фиолетовыми или фиолетовыми пятнами с одной стороны и беловойлочно-опушенных или голых (волоски опали при измельчении) с беловато-серой, зеленовато-серой, реже коричневато-желтой мелкоямчатой поверхностью с другой стороны; кусочки коричневато-зеленых и фиолетово-зеленых черешков.

Цвет измельченного сырья светло-зеленый, зеленый, беловато-серый, серовато-зеленый, с желтовато-зелеными, коричневато-зелеными, светло-коричневыми или фиолетовыми вкраплениями. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения слабо-горьковатый с ощущением слизистости.

Примечания. Возможные примеси:

А) Лопух войлочный (*Arctium tomentosum* Mill.). Молодые прикорневые листья лопуха войлочного простые, цельные, длинночерешковые, образуют розетку; яйцевидной формы, с тупой верхушкой или с остроконечием, сердцевидным основанием и цельнокрайние или с расставлено зубчатым краем. Сверху листья – голые или слегка опушенные; снизу – с беловато-войлочным опушением. Отчетливо видна широкая главная жилка. При рассмотрении листьев под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видно, что верхняя сторона листовой пластинки покрыта прижатыми волосками; нижняя – с густо, серовато- или беловато-паутинисто-войлочным опушением и желтыми сидячими железками. Цвет листьев с верхней стороны зеленый, с нижней – серовато-зеленый; черешков – светло-зеленый или серовато-зеленый.

Б) Лопух большой (*Arctium lappa* L.). Молодые прикорневые листья лопуха большого простые, цельные, длинночерешковые, образуют розетку; широко-сердцевидно-яйцевидной формы, с тупой верхушкой, сердцевидным или выемчатым основанием и мелко выемчато-зубчатым краем или цельнокрайние. Сверху листья – голые или с редкими короткими волосками; снизу – опушенные.

При рассмотрении листьев под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видно, что верхняя сторона листовой пластинки покрыта редкими короткими волосками; нижняя – с серовойлочным опушением и рассеянными желтыми сидячими железками. Цвет листьев с верхней стороны зеленый, с нижней – серовато-зеленый; черешков – зеленовато-коричневый.

В) Белокопытник холодный (*Petasites frigidus* (L.) *Fries*).

Прикорневые (настоящие) листья белокопытника холодного простые, длинночерешковые, образуют прикорневую розетку, треугольно-сердцевидные, заостренные, 3 – 15 см длиной и почти такой же ширины. По краям глубоко выемчато-зубчатые, почти лопастные. Сверху листья – почти голые, снизу – с войлочным опушением.

При рассмотрении сухих листьев под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видно, что верхняя сторона листовой пластинки слегка паутинисто-пушистая или почти голая, нижняя – плотно серовато-войлочная.

Цвет листьев с верхней стороны зеленовато-коричневый, с нижней – серо-зеленый или серо-коричневый; черешков – серо-зелено-коричневый.

Г) Белокопытник гладкий (сияющий) (*Petasites radiatus* (J. F. Gmel.)).

Настоящие (прикорневые) листья белокопытника гладкого простые, цельные, крупные, длинночерешковые, треугольно-почковидные, коротко заостренные, широкозубчатые, 5 – 15 см длиной и 10 – 25 см шириной, совершенно голые.

При рассмотрении листьев под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видно, что верхняя сторона листовой пластинки голая, нижняя – с редким клочковатым пушком.

Цвет листьев зеленый, сухих листьев с верхней и нижней стороны – зеленовато-коричневый или серовато-коричневый; черешков – темно-коричневый.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье, измельченное сырье.* При рассмотрении с поверхности эпидермиса верхней стороны листовой пластинки видны крупные многоугольные клетки с прямыми или четковидно-утолщенными боковыми стенками. Над жилками эпидермальные клетки вытянуты, остальные – изодиаметрические. Кутикула толстая, морщинисто-складчатая, над жилками продольно-складчатая.

Клетки нижнего эпидермиса с сильно извилистыми стенками. Кутикула толстая, морщинисто-складчатая, над жилками продольно-складчатая. Устьица крупные, овальные, окруженные 4 – 8 клетками эпидермиса (аномоцитный тип), расположены на верхней и нижней стороне листа, с нижней стороны их больше (амфистоматический лист), и они погружены в мезофилл (погруженные устьица). Углубления, в которых находятся устьица, прикрыты устьичными криптами из 4 – 8 клеток (выросты эпидермиса). Вокруг устьиц заметна радиальная складчатость кутикулы. Под эпидермисом видна аэренхима.

Клетки аэренхимы расположены однорядными цепочками, образующими крупные воздухоносные полости.

Верхняя сторона листа почти голая, нижняя – покрыта многочисленными простыми бичевидными волосками и волосками со спавшимися стенками. На верхнем эпидермисе видны места прикрепления волосков, вокруг которых клетки эпидермиса с почти прямыми стенками и радиальной складчатостью кутикулы, расположенные лучисто, образуют розетку. В центре розетки виден круглый валик. Бичевидные волоски состоят из короткого основания, образованного 3 – 6 небольшими клетками, и длинной конечной, шнуровидной, сильно извилистой клетки. Волоски переплетаются между собой. Встречаются фрагменты эпидермиса нижней стороны листа характерного строения, но без волосков (опали при измельчении), при этом видны округлые места их прикрепления.

ФЭМБ
Федеральная электронной медицинская библиотека

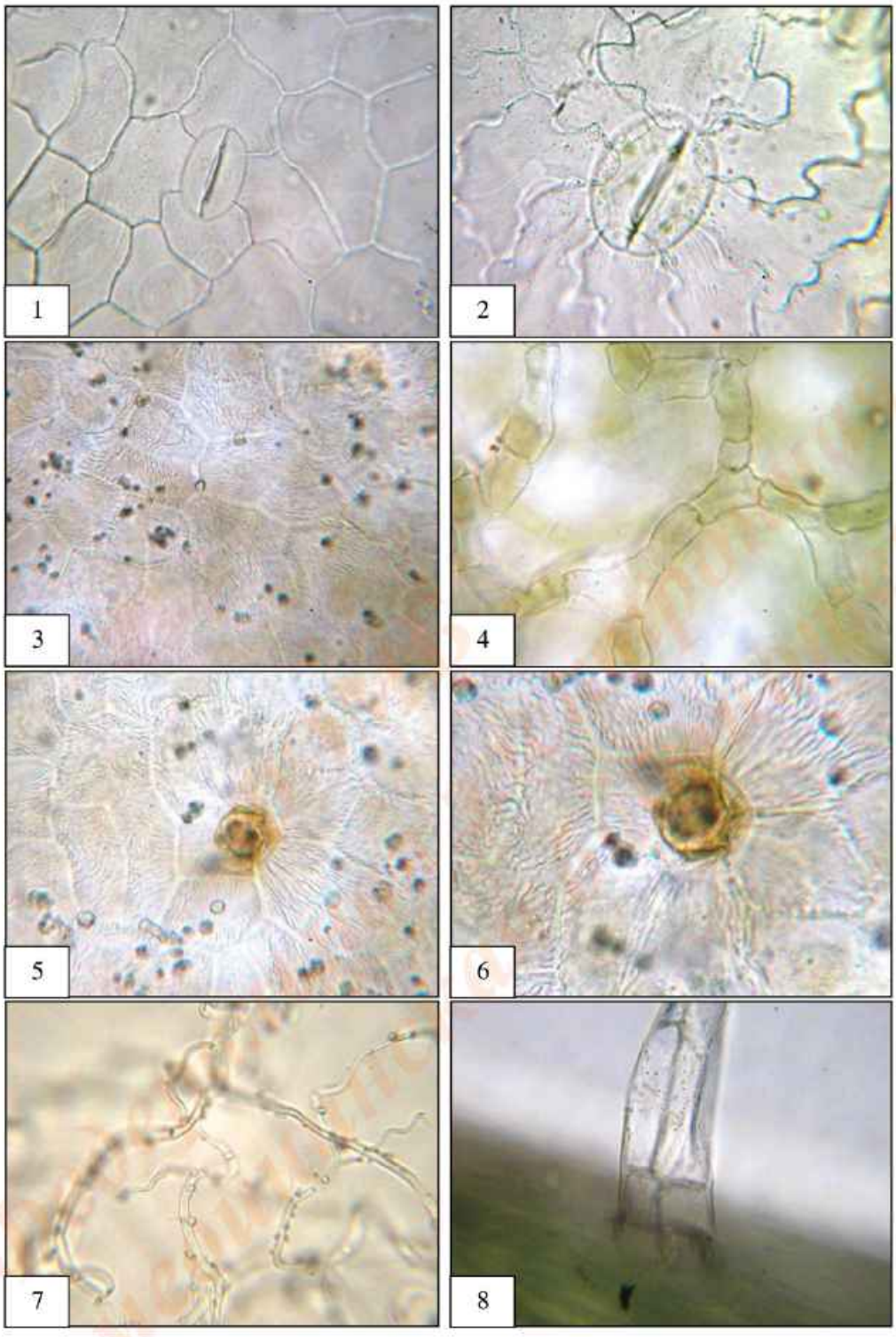


Рисунок – Мать-и-мачехи обыкновенной листья.
Верхний (1) и нижний эпидермис (2) с устьичными криптами из 4 – 5 клеток и погруженными устьицами (аномоцитный тип); 3 – морщинисто-складчатая кутикула верхнего эпидермиса; 4 – аэренхима; 5, 6 – место прикрепления волоска; 7 – бичевидные волоски; 8 – основание волоска (640×).

Определение основных групп биологически активных веществ

1. Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов

Раствор стандартного образца (СО) рутина. Около 0,001 г рутина (рутина тригидрата) растворяют в 10 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Дифенилборилоксиэтиламин раствор 1 % в спирте 96 %. 1,0 г дифенилборилоксиэтиламина (дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира) растворяют в 100 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

1. Около 1,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм (войлочные комья волосков, не прошедшие сквозь сито – отбрасывают), помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл спирта, нагревают на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 10 мин. После охлаждения до комнатной температуры полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля на алюминиевой подложке размером 10×10 см в виде полос длиной 1 см, шириной не более 3 мм наносят по 20 мкл испытуемого раствора и раствора СО рутина. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре в течение 15 мин, помещают в камеру предварительно выложенной изнутри фильтровальной бумагой и насыщенной менее 30 мин смесью растворителей этилацетат - муравьиная кислота безводная - вода (40:4:6) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % от длины пластинки, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей в вытяжном шкафу, после чего просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО рутина должна обнаруживаться зона бледно-желтого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должно обнаруживаться не менее четырех зон абсорбции: две желтовато-серые зоны адсорбции; над ними две голубовато-серые зоны при этом одна зона в два раза шире.

Затем пластинку нагревают в сушильном шкафу в течение 2 - 3 мин при 100 - 105 ºС, еще теплую обрабатывают дифенилборилоксиэтиламина раствором 1 % в спирте 96 % и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО рутина видна желтая флуоресцирующая зона. На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться (снизу вверх от линии старта): две зоны с желтой флуоресценцией; зона с голубой флуоресценцией, почти не разделенная с одной из зон желтого цвета; две зоны с голубой флуоресценцией.

2. Около 10,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, помещают в колбу со шлифом вместимостью 500 мл, прибавляют 200 мл воды, колбу присоединяют к обратному холодильнику и кипятят при перемешивании на плитке в течение 30 мин. Экстракцию повторяют еще 2 раза, используя первый раз 200 мл, второй раз 100 мл воды. Водные извлечения объединяют и центрифугируют с частотой вращения 5000 об/мин в течение 10 мин и декантируют в мерную колбу вместимостью 500 мл через 5 слоев марли, вложенной в стеклянную воронку диаметром 55 мм и предварительно промытую водой. Фильтр промывают водой, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

а) К 10 мл приготовленного раствора прибавляют 30 мл спирта 96 % и перемешивают; должны появляться хлопьевидные сгустки, выпадающие в осадок при стоянии (полисахариды).

б) Раствор с осадком фильтруют через стеклянный фильтр ПОР 16, осадок с фильтра переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл с натрия гидроксида раствором 0,1 М и им же доводят раствор до метки, перемешивают. К 1 мл полученного раствора прибавляют 0,25 мл карбазола

раствора 0,5 % и 5 мл серной кислоты концентрированной, перемешивают и нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 мин; появляется красно-фиолетовое окрашивание (галактуроновая кислота).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 13 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 20 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 10 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* измельченных частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье*: 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 %.

Посторонние примеси.

Листья темно-коричневые и с темно-коричневыми пятнами ржавчины. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 8 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 2 %.

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

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:* сумма полисахаридов и свободных сахаров в пересчете на глюкозу – не менее 10 %.

Приготовление растворов.

Натрия гидроксида раствор 40 %. 40,0 г натрия гидроксида растворяют в 60 мл воды в мерной колбе вместимостью 100 мл. Охлаждают под струей холодной воды до полного остывания, доводят объем раствора в колбе водой до метки и перемешивают. Раствору дают отстояться и прозрачную жидкость сливают с осадка. Срок годности раствора 6 мес при хранении в упаковке из стекла укупоренной резиновой пробкой.

Натрия карбоната раствор 20 %. 20,0 г натрия карбоната безводного растворяют в 60 мл воды в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. При необходимости фильтруют. Срок годности раствора 2 мес при хранении в упаковке из стекла укупоренной резиновой пробкой.

Пикриновой кислоты раствор 1 %. 1,0 г пикриновой кислоты растворяют в 50 мл спирта 96 % в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают. Хранят в упаковке из стекла с притертой пробкой, в защищенном от света месте, вдали от огня.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих через сито с отверстиями размером 0,5 мм. Около 2,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 40 мл воды и 4 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры под струей холодной воды и процеживают через 5 слоев марли в мерную колбу вместимостью 100 мл. Остатки сырья в колбе промывают 10 мл воды. Марлю с остатками сырья помещают в ту же колбу с сырьем и экстракцию повторяют еще один раз указанным выше способом. Полученное извлечение процеживают через 5 слоев марли в ту же мерную колбу, марлю промывают, доводят объем извлечения водой до метки и перемешивают (раствор А).

В коническую колбу вместимостью 50 мл помещают 10,0 мл раствора

А, прибавляют по каплям натрия гидроксида раствор 40 % до получения раствора с pH 4,0 – 4,5. Раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр (раствор Б), отбрасывая первые 10 – 15 мл фильтрата.

В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 2,5 мл пикриновой кислоты раствора 1 % и 7,5 мл натрия карбоната раствора 20 %, перемешивают. В эту же мерную колбу помещают 5,0 мл раствора Б и колбу с содержимым нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 мин. Затем мерную колбу охлаждают до комнатной температуры под струей холодной воды, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (раствор В).

В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2,5 мл пикриновой кислоты раствора 1 %, 7,5 мл натрия карбоната раствора 20 % и 5 мл воды, помещенных в мерную колбу вместимостью 100 мл. Мерную колбу с содержимым нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 мин, после чего охлаждают до комнатной температуры под струей холодной воды, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Оптическую плотность раствора В измеряют относительно раствора сравнения на спектрофотометре при длине волны 470 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Содержание суммы полисахаридов и свободных сахаров в пересчете на глюкозу в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 50 \cdot 100 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 10 \cdot 5 \cdot (100 - W)}$$

где A – оптическая плотность раствора В;

$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса глюкозы с пикриновой кислотой при длине волны 470 нм, равный 273,24;

a – навеска сырья, г;

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».

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Можжевельника обыкновенного плоды	**ФС.2.5.0028.15**
Juniperi communis fructus	**Взамен ГФ X ст. 291**
	Взамен ГФ XI ст. 34

Собранные в фазу полного созревания, высушенные плоды (шишко-ягоды) дикорастущих кустарников можжевельника обыкновенного – *Juniperus communis* L. , сем. кипарисовых – *Cupressaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырьё.* Плоды шишко-ягоды 6 - 10 мм в диаметре, цилиндрической формы, шаровидные, иногда овальные или эллиптические, часто по бокам вдавленные, гладкие, блестящие, реже матовые. Плоды образованы 3 сросшимися семенными плодолистиками. На верхушке заметен трёхлучевой шов, образованный сросшимися чешуевидными мегаспорофиллами, иногда они с выдающимися кончиками, отвёрнутыми назад; при основании плода заметны под лупой (10×) 2 трёхлистные мутовки из светло-коричневых чешуек (неоплодотворённые чешуевидные мегаспорофиллы шишки). В мякоти находится 3 (иногда 1 или 2) семени. Семена овально-продолговатые, тупо-трехгранные, выпуклые снаружи и плоские на соприкасающихся сторонах, длиной 4 – 5 мм. Кожура семени твёрдая. Цвет плодов снаружи почти черный или фиолетовый с коричневым оттенком, иногда с серо-голубым восковым налетом. Цвет мякоти зеленовато-коричневый, цвет семян желтовато-коричневый. Запах своеобразный, ароматный. Вкус водного извлечения сладковатый, пряный.

Порошок. Смесь частиц светло-коричневого цвета с многочисленными чёрными вкраплениями, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2

мм. Запах своеобразный, ароматный. Вкус водного извлечения сладковатый, пряный.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении препарата кожуры с поверхности видны клетки эпидермиса округло-многоугольные с утолщёнными стенками. В боковых стенках имеются поры. Наружные стенки клеток значительно утолщены слоем кутикулы.

На поперечном срезе видно, что под эпидермисом находятся 2 ряда клеток гиподермы, которые крупнее эпидермальных. Клетки эпидермиса и гиподермы заполнены красновато-коричневым содержимым. Мякоть плода состоит из тонкостенных паренхимных клеток овальной формы, на некоторых имеются выросты. В клетках паренхимы расположены идиобласты и вместилища с эфирным маслом. Идиобласты – крупные с толстыми стенками. Вместилища эфирного масла округлой формы, схизолизигенного типа, разного диаметра, крупные, особенно около семян. Среди паренхимы проходят проводящие пучки с характерной склеренхимной обкладкой и тонкостенными волокнистыми элементами. Ксилема проводящих пучков состоит из сосудов 3 типов: с окаймлёнными порами, окаймлённые и спиральные, только спиральные. Внутренняя оболочка шишко-ягоды содержит 10 слоев каменистых клеток. Склереиды имеют среднюю степень лигнификации.

При рассмотрении давленого препарата плода видны фрагменты эпидермиса, состоящего из округло-многоугольных клеток с толстыми пористыми стенками, часто с остатками прилегающего слоя гиподермы красновато-коричневого цвета; редко – фрагменты эпидермиса с устьицами и сосочковидными выростами (встречаются только в области бороздок на верхушке плода); клетки паренхимы округлой или неправильной формы из-за выростов; крупные клетки паренхимы округлой, овальной или неправильной формы, толстостенные с хорошо заметными щелевидными порами; эфирномасличные вместилища − мешковидные образования от веретенообразной до округлой формы, с прозрачным или белесым, мягким

или затвердевшим смолистым содержимым; проводящие пучки, включающие различные элементы: трахеиды с окаймленными порами, мелкие спиральные сосуды, элементы переходной формы − с окаймленными порами и спиралями, волокна со щелевидными порами, редко встречаются перегородчатые трахеиды.

Порошок. При рассмотрении порошка видны фрагменты кожуры семени, состоящей из расположенных пластами каменистых клеток желтоватого цвета, округлой или 5–6-угольной формы, в узкой полости которых иногда встречаются кристаллы оксалата кальция, клетки эпидермиса плода с коричневым содержимым. Мякоть плода состоит из рыхлой тонкостенной паренхимы. Редко встречаются клетки со слабо утолщёнными стенками, фрагменты колленхимы стенки плода, фрагменты эндосперма и зародыша с каплями жирного масла и алейроновыми зёрнами.

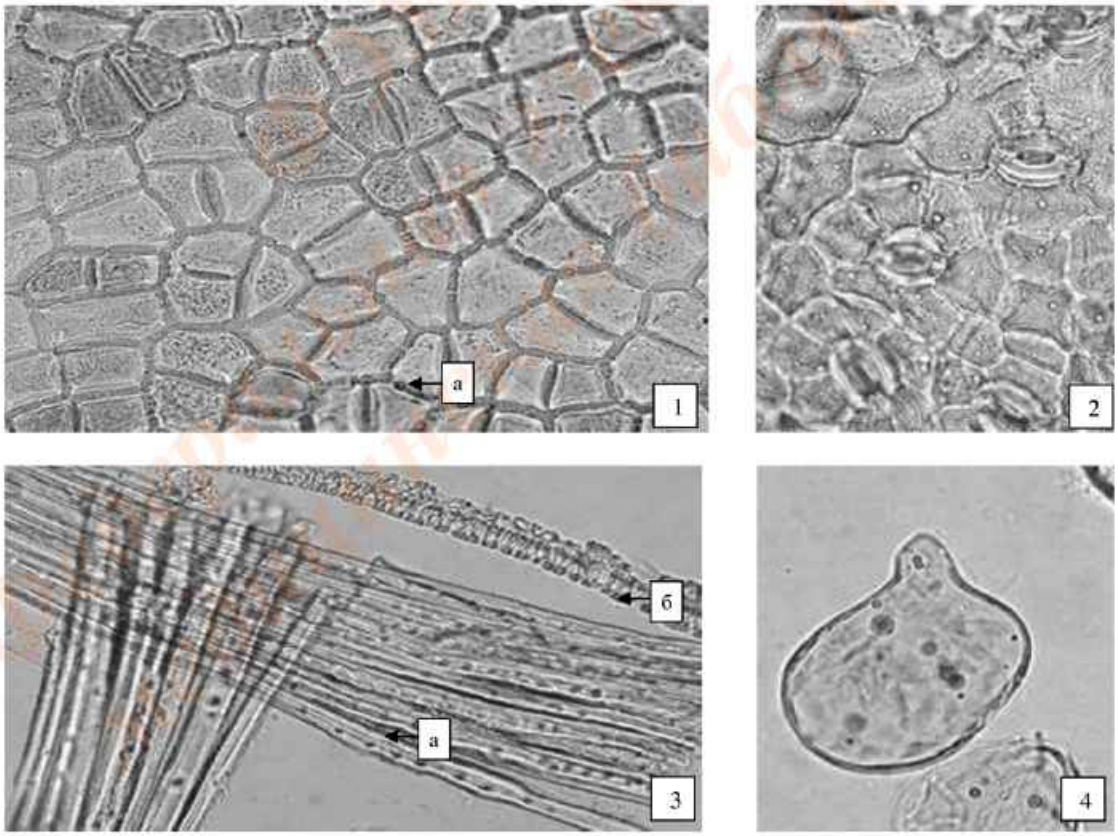


Рисунок – Можжевельника обыкновенного плоды.
1 – многоугольные клетки эпидермиса с пористыми стенками (200×),
2 – фрагмент эпидермиса с устьицами в области бороздки на верхушке плода

(200×), 3 – группы сосудов с окаймленными порами (а) и спиральные сосуды (б) (200×), 4 – клетка паренхимы с выростом (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) судана III. Около 0,005 г судана III растворяют в 10 мл спирта 96 %. Срок годности раствора 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор СО судана красного G. Около 0,0025 г судана красного G растворяют в 10 мл спирта 96 %. Срок годности раствора 6 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Анисового альдегида раствор. Смешивают последовательно: 0,5 мл анисового альдегида, 10 мл уксусной кислоты ледяной, 85 мл спирта 96 % и 5 мл серной кислоты концентрированной. Срок годности раствора 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около 1,0 г сырья, измельченного до отсутствия цельных плодов, помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, приливают 10 мл спирта 96 % и нагревают с обратным холодильником на водяной бане в течение 10 мин. После охлаждения до комнатной температуры извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля на алюминиевой подложке размером 10 × 15 см наносят 10 мкл испытуемого раствора и по 5 мкл раствора СО судана красного G и раствора СО судана III. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин смесью растворителей гексан – этилацетат – муравьиная кислота безводной (15:5:0,1), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 - 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры и сушат до удаления следов растворителей. Пластинку обрабатывают анисового альдегида раствором, выдерживают в сушильном шкафу при 100 – 105 °С в течение 2 – 3 мин и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме растворов СО судана III и СО судана красного G должны обнаруживаться: зона судана красного G розово- или фиолетово-красного цвета и зона судана III фиолетово- или сине-красного цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться (снизу вверх от линии старта) зоны: фиолетово-розового цвета ниже зоны судана красного G; интенсивная сине-фиолетового цвета и интенсивная серо-синего цвета выше зоны судана красного III; допускается обнаружение дополнительных слабовыраженных зон.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырьё, порошок* – не более 20 %.

Зола общая. *Цельное сырьё, порошок* – не более 5 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырьё, порошок* – не более 1 %.

Измельченность сырья. *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

Плоды, которые приобрели темно-коричневую окраску. *Цельное сырьё* – не более 9,5 %.

Зелёные плоды. *Цельное сырьё* – не более 0,5 %.

Органическая примесь (части других неядовитых растений и хвои можжевельника). *Цельное сырьё* – не более 1 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырьё, 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 сырьё, порошок:* эфирного масла – не менее 0,5 %.

Определение эфирного масла проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 2, из навески 15,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, объем воды 300 мл, время перегонки - 2 ч).

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».

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Мяты перечной листья	**ФС.2.5.0029.15**
Menthae piperitae folia	**Взамен ГФ X ст. 280**
	Взамен ГФ XI ст. 18
	(изм. № 1 от 14.11.1996)

Собранные в фазу цветения механизированным способом и обмолоченные, высушенные листья многолетнего культивируемого травянистого растения мяты перечной – *Mentha piperita* L., сем. яснотковых – *Lamiaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Различной формы кусочки листьев, стеблей, реже – цветков и бутонов, размером 10 мм и более.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны: фрагменты листовых пластинок (у некоторых сохранился пильчатый край с неровными острыми зубцами), черешков, редко встречаются элементы чашечки и венчика. На поверхности листовых пластинок и чашечек видны многочисленные округлые блестящие железки от золотисто-желтого до темно-коричневого цвета, снизу по жилкам заметны слегка прижатые волоски беловатого цвета. На стеблях волоски немногочисленные, железки встречаются очень редко.

Цвет листьев от светло-зеленого до темно-зеленого; стеблей – от зеленого до темно-зеленого или зеленовато-коричневого, зеленовато-фиолетового; бутоны и цветки с чашечками – от светло-зеленого до зеленовато-коричневого и венчиками – от бледно-фиолетового до

коричневато-фиолетового цвета. Запах сильный, ароматный. Вкус водного извлечения жгучий, холодящий.

Измельченное сырье. Смесь кусочков листьев, стеблей, редко – цветков и бутонов, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны: фрагменты листовых пластинок, черешков, реже встречаются элементы чашечки и венчика. На поверхности листовой пластинки видны многочисленные округлые блестящие железки от золотисто-желтого до темно-коричневого цвета, снизу по жилкам могут располагаться слегка прижатые волоски беловатого цвета. На фрагментах стеблей волоски немногочисленные, железки встречаются очень редко.

Цвет от светло-зеленого до темно-зеленого или зеленовато-коричневого с зеленовато-фиолетовыми, серовато-белыми, желтовато-белыми, коричневато-белыми, бледно-фиолетовыми, коричневато-фиолетовыми, фиолетовыми, черными вкраплениями. Запах сильный, ароматный. Вкус водного извлечения жгучий, холодящий.

Порошок. Смесь кусочков листьев, стеблей, редко – цветков и бутонов, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны: фрагменты листовых пластинок, черешков, стеблей, реже встречаются элементы чашечки и венчика. На поверхности листовой пластинки видны многочисленные округлые блестящие железки от золотисто-желтого до темно-коричневого цвета, снизу по жилкам могут располагаться слегка прижатые волоски беловатого цвета. На фрагментах стеблей волоски немногочисленные, железки встречаются очень редко.

Цвет от светло-зеленого до темно-зеленого или зеленовато-коричневого с зеленовато-фиолетовыми, серовато-белыми, желтовато-белыми, коричневато-белыми, бледно-фиолетовыми, коричневато-фиолетовыми, темно-коричневыми, фиолетовыми, черными вкраплениями. Запах сильный, ароматный. Вкус водного извлечения жгучий, холодящий.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье, измельченное сырье.* При рассмотрении микропрепаратов листа с поверхности с верхней и нижней стороны видны клетки эпидермиса с сильно извилистыми стенками, устьица с 2 околоустьичными клетками, расположенными перпендикулярно продольной оси устьица (диацитный тип). Возможно наличие простых 2–4-клеточных волосков с бородавчатой кутикулой, в основном по жилкам и по краю листа. По всей поверхности имеются мелкие головчатые волоски, состоящие из короткой одноклеточной ножки и одноклеточной обратнояйцевидной головки. В небольших углублениях с обеих сторон листа видны эфирномасличные железки, они имеют короткую ножку и округлую головку, состоящую из 8, редко 6 радиально расположенных выделительных клеток (не всегда ясно заметных). При рассмотрении чашелистиков и венчика с поверхности видны клетки эпидермиса с сильно извилистыми стенками; эпидермис лепестков со складчатой кутикулой, а клетки внутреннего эпидермиса имеют сосочковидные выросты. Устьица редкие, диацитного типа, расположены на чашелистиках с наружной стороны. На поверхности чашелистиков и венчика, и по краю чашелистиков видны волоски и железки такие же, как на листьях.

При рассмотрении давленого препарата стебля видны прямоугольные вытянутые клетки эпидермиса с прямыми стенками, на поверхности встречаются простые головчатые волоски и эфирномасличные железки, характерные для листьев мяты; механические волокна; сосуды лестничного и спирального типа.

Порошок. При рассмотрении микропрепаратов видны: фрагменты листа с эпидермисом из клеток с сильно извилистыми стенками и устьицами диацитного типа. На некоторых фрагментах встречаются 2–4-клеточные бородавчатые простые волоски, по всей поверхности имеются мелкие головчатые волоски, состоящие из короткой одноклеточной ножки и одноклеточной обратнояйцевидной головки, округлые эфирномасличные железки желтовато-коричневого цвета, состоящие из 8, реже

6 выделительных клеток, расположенных радиально; железки нередко смяты. Иногда встречаются фрагменты тканей черешков, чашелистиков, редко – венчика, несущие характерные для данного объекта диагностические признаки (волоски, железки), отдельно лежащие многоклеточные волоски, которые часто деформированы, и их фрагменты.

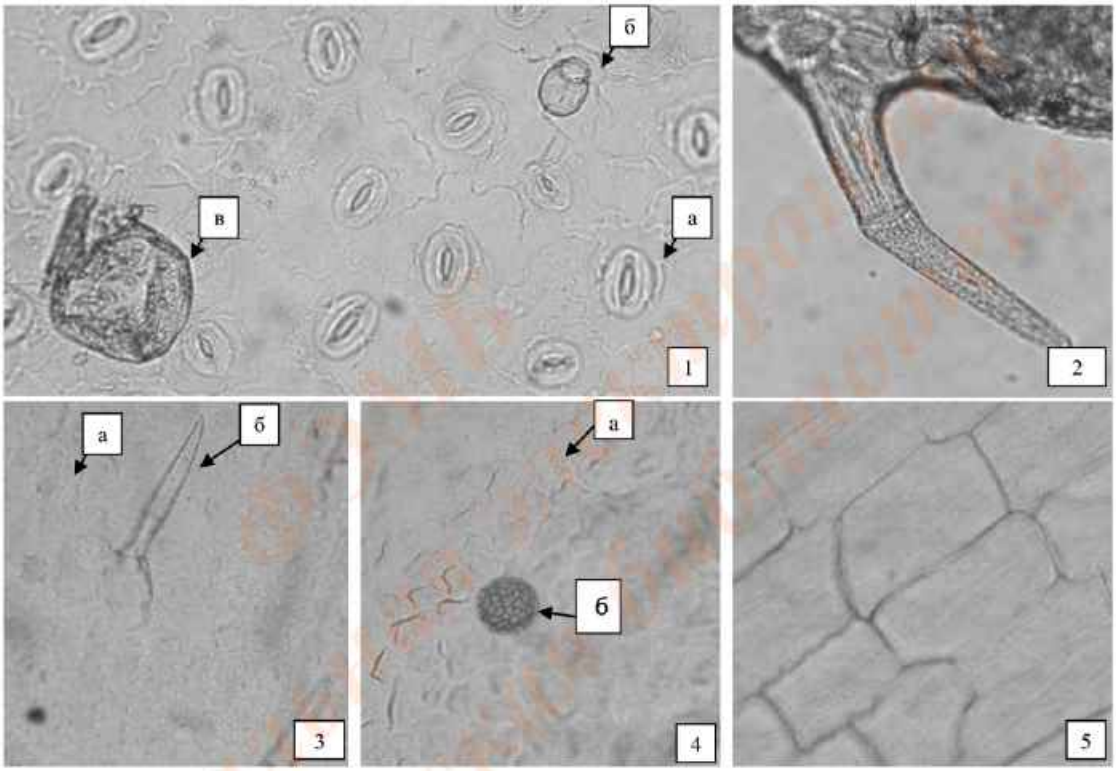


Рисунок – Мяты перечной листья.
1 – фрагмент эпидермиса листа: а – клетки эпидермиса с извилистыми стенками и устьицами диацитного типа, б – головчатый волосок, в – эфирномасличная железка (200×), 2 – простой бородавчатый волосок, (200×), 3 – фрагмент венчика: а – эпидермис с извилистыми стенками, б – простой бородавчатый волосок (200×), 4 – фрагмент венчика: а – эпидермис с сосочковидными выростами, б – пыльца (200×), 5 – фрагмент эпидермиса стебля (400×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор для детектирования. Смешивают последовательно: 0,5 мл анисового альдегида (4-метоксибензальдегида), 10 мл уксусной кислоты ледяной, 85 мл спирта 96 % и 5 мл серной кислоты концентрированной. Срок годности раствора не более 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор стандартного образца (СО) тимола. Около 0,01 г СО тимола растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор СО ментола. Около 0,01 г СО ментола (левоментола) 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 сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 5 мл дихлорметана и взбалтывают в течение 10 мин, затем извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля на пластиковой подложке размером 10 × 15 см наносят 10 мкл испытуемого раствора в виде полос длиной 10 мм, шириной не более 2 мм и параллельно в одну полосу и по 5 мкл раствора СО ментола и раствора СО тимола.

Пластинку с нанесенными пробами сушат, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 60 мин смесью растворителей толуол – этилацетат (95:5), 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 раствором для детектирования, выдерживают в сушильном шкафу при 100 – 105 °С в течение 3 – 5 мин и просматривают сразу же при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО ментола должна обнаруживаться зона адсорбции синего или фиолетового цвета; на хроматограмме раствора СО тимола – зона адсорбции красного или оранжево-красного цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться: зона адсорбции синего, сине-зеленого, зеленого или фиолетового цвета на уровне зоны на хроматограмме раствора СО ментола, зона адсорбции синего, сине-зеленого, зеленого или фиолетового цвета ниже зоны ментола, зона адсорбции фиолетового цвета выше зоны на хроматограмме раствора СО тимола; допускается обнаружение зоны адсорбции красного или розового цвета ниже зоны тимола, зон синего, сине-зеленого или зеленого цвета ниже зоны ментола и выше зоны тимола, зоны адсорбции коричневого цвета на линии старта и других дополнительных зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

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

Зола общая. *Цельное сырь, измельченное сырье, порошок* – не более 14 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 6 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 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 0,18 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.

Листья, изменившие окраску (потемневшие и почерневшие). *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 5 %.

Стебли. *Цельное сырье* – не более 10 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3 %.

ЭЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

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

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*: эфирного масла – не менее 1 %; суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин – не менее 0,6 %. *Измельченное сырье:* эфирного масла – не менее 0,8 %; суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин – не менее 0,6 %. *Порошок:* эфирного масла – не менее 0,8 %; суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин – не менее 0,6 %.

Эфирное масло.

В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 2, из навески 30,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, объем воды 300 мл, время перегонки - 1 ч).

Сумма флавоноидов.

Приготовление растворов.

Раствор СО лютеолина. Около 0,01 г (точная навеска) СО лютеолина, предварительно высушенного при температуре 130 – 135 ºС в течение 3 ч, растворяют в 25 мл спирта 96 % в мерной колбе вместимостью 50 мл при нагревании на кипящей водяной бане, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и

перемешивают (раствор А СО лютеолина). Срок годности раствора не более 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

1,0 мл раствора А СО лютеолина, 2 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 % и 0,1 мл уксусной кислоты концентрированной, доведенного спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл (раствор Б СО лютеолина). Срок годности раствора не более 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм. Около 0,5 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл спирта 70 %, колбу взвешивают с погрешностью $\pm$ 0,01 г, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 1,5 ч. Колбу охлаждают до комнатной температуры и взвешивают, при необходимости доводят спиртом 70 % до первоначальной массы. Содержимое колбы фильтруют через бумажный складчатый фильтр, отбрасывая первые 25 мл фильтрата (раствор А испытуемого раствора).

5,0 мл раствора А испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 % и 0,1 мл уксусной кислоты концентрированной, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора).

Оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора измеряют через 40 мин на спектрофотометре при длине волны 400 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 5 мл раствора А испытуемого раствора и 0,1 мл уксусной кислоты концентрированной, доведенный спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО лютеолина в таких же условиях. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл раствора А СО лютеолина, 0,1 мл уксусной кислоты концентрированной, доведенный спиртом 96 % до метки в мерной

колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 25 \cdot P \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot 50 \cdot 25 \cdot a \cdot 5 \cdot 100 \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
A_0 – оптическая плотность раствора Б СО лютеолина;
a – навеска сырья, г;
a_0 – навеска СО лютеолина, г;
P – содержание основного вещества в СО лютеолина, %;
W – влажность сырья, %.

Допускается содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин вычислять с использованием удельного показателя поглощения комплекса лютеолина с алюминия хлоридом по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 5 \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса лютеолина с алюминия хлоридом при длине волны 400 нм, равный 549,41;
a – навеска сырья, г;
W – влажность сырья, %.

Примечание. Определение эфирного масла и суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин проводят для сырья, предназначенного для производства лекарственных растительных препаратов (пачки, фильтр-пакеты), определение эфирного масла – для сырья, предназначенного для получения эфирного масла, настойки.

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».

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Ноготков лекарственных цветки	**ФС.2.5.0030.15**
Calendulae officinalis flores	**Взамен ФС 42-0168-06**
	(изм. № 3 от 2.09.1999)

Собранные в начале распускания трубчатых цветков и высушенные цветочные корзинки культивируемого однолетнего травянистого растения ноготков лекарственных (календулы лекарственной) – *Calendula officinalis* L., сем. астровых – *Asteraceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Цельные или частично осыпавшиеся корзинки диаметром до 5 см, без цветоносов или с остатками цветоносов длиной не более 3 см. Обвертка серовато-зеленая, одно-, двухрядная; листочки ее линейные, заостренные, густоопушенные. Цветоложе слегка выпуклое, голое. Краевые цветки язычковые, длиной 15 – 28 мм, шириной 3 – 5 мм с изогнутой короткой опушенной трубкой, трехзубчатым отгибом, вдвое превышающим обвертку, и 4 – 5 жилками. Цветки расположены в 2 – 3 ряда у немахровых и в 10 – 15 рядов у махровых форм. Пестик с изогнутой нижней одногнездной завязью, тонким столбиком и двухлопастным рыльцем. Срединные цветки трубчатые с пятизубчатым венчиком. Изредка встречаются недозрелые плоды и их кусочки различной формы.

Цвет краевых цветков красновато-оранжевый, оранжевый, ярко- или бледно-желтый; срединных – оранжевый, желтовато-коричневый или желтый; незрелых плодов – зеленый, серовато-зеленый, желтовато-зеленый,

Федеральный ЭМБ Электронная медицинская библиотека

желтовато-коричневый и коричневый. Запах слабый. Вкус водного извлечения солоновато-горький.

Измельченное сырье. Смесь кусочков цветоложа, язычковых, трубчатых цветков, листочков обвертки и их фрагментов, цветоносов, изредка кусочков недозрелых плодов проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм.

При просмотре под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны: кусочки цветоложа голые, часто с сохранившимися остатками обвертки по краю; язычковые цветки на верхушке трехзубчатые, обычно с оборванным трубчатым основанием; трубчатые цветки пятизубчатые, часто нераскрывшиеся (в виде бутонов); густоопушенные листочки обвертки серовато-зеленого цвета, узкие ланцетовидные с более светлой полосой по краю и слегка выступающей главной жилкой; цилиндрические кусочки цветоносов. Цвет язычковых цветков красновато-оранжевый, оранжевый, ярко-желтый или бледно-желтый; трубчатых цветков светло-желтый, желтый; листочков обвертки серовато-зеленый; незрелых плодов – зеленый, серовато-зеленый, желтовато-зеленый, желтовато-коричневый и коричневый; цветоложа – светло-серый, зеленовато- или коричневато-серый; цветоносов – серовато-зеленый.

Цвет измельченного сырья зеленовато-желтый с вкраплениями серовато-зеленого, красновато-оранжевого, оранжевого, светло-желтого, зеленого, желтовато-коричневого и коричневого цвета. Запах слабый. Вкус водного извлечения солоновато-горький.

Порошок. Смесь частиц ноготков цветков проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны: кусочки краевых язычковых цветков ланцетной формы с длинным отгибом, оранжевого или желтого цвета, с 3 зубчиками, с изогнутой коротко опушенной трубкой; цельные длинные (3 – 5 мм) трубчатые цветки, преимущественно их части, пятизубчатые, оранжево-желтого или желтого

цвета; фрагменты сероватого цветоложа, кусочки густоопушенной обвертки зеленовато-серого цвета, с плотной темной срединной жилкой и пленчатым полупрозрачным краем, изредка кусочки плодов зеленого, серовато-зеленого, желтовато-зеленого, желтовато-коричневого и коричневого цвета; кусочки серовато-зеленых цветоносов.

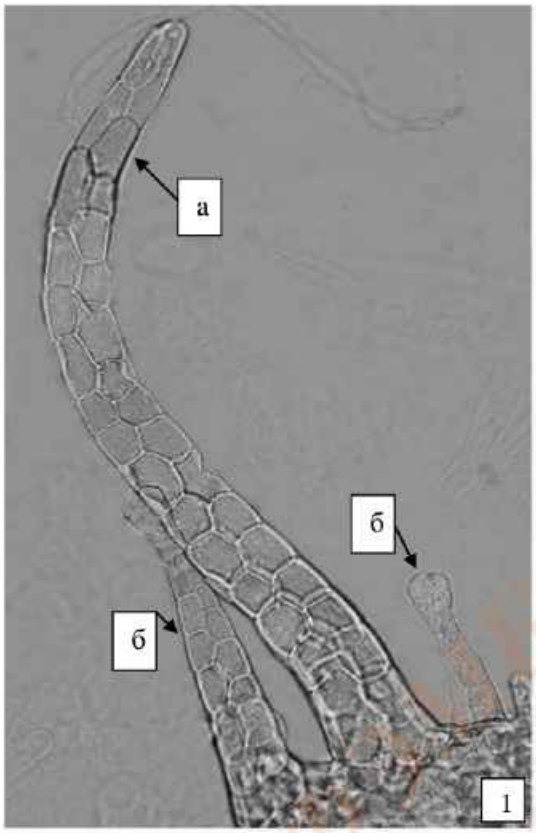
Цвет порошка зеленовато-желтый с вкраплениями серовато-зеленого, красновато-оранжевого, оранжевого, светло-желтого, зеленого, желтовато-коричневого и коричневого цвета. Запах слабый. Вкус водного извлечения солоновато-горький.

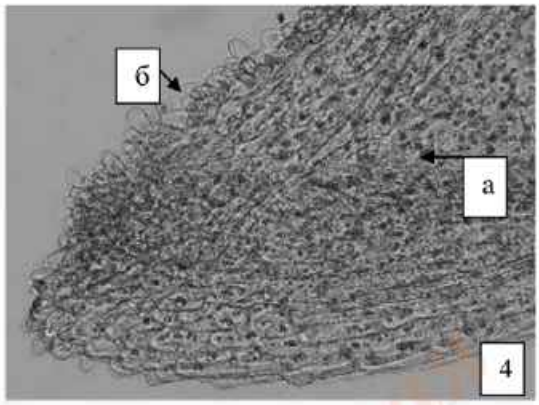
Микроскопические признаки. *Цельное, измельченное сырье.* При рассмотрении микропрепарата язычковых цветков с поверхности должны быть видны удлиненные клетки эпидермиса с оранжевыми округлыми хромопластами и покрыты ярко выраженной кутикулой; с хорошо заметными мелкими друзами оксалата кальция в мезофилле цветка; на зубчиках эпидермис с сосочками, иногда с устьицами; трубка венчика густо опушена одно-, двухрядными волосками; завязь также опушена: с выпуклой стороны железистыми, по краям вогнутой стороны - простыми двухрядными волосками; фрагменты цветоложа с головчатыми волосками, их обломками или местами их прикрепления в виде 2 базальных тонкостенных клеток восьмеркообразной формы. Головка железистых волосков состоит из 2, 4 или 8 клеток. Эпидермис трубчатых цветков такой же, как у язычковых, но у зубчиков он с более вытянутыми сосочками; нижняя часть трубки венчика и завязь густо опушены одно-, двухрядными железистыми, реже двухрядными простыми волосками. Складчатость кутикулы, обычно маскируемая хромопластами, просматривается только на отдельных участках. Пыльца округлая и округло-трех-, четырехгранная шиповатая трех-четырехпоровая. Эпидермис листочков обвертки по краю представлен удлиненными клетками с прямыми стенками, в средней части - извилистыми стенками и устьицами, устьица аномоцитного типа; листочки обвертки густо опушены: по краю –

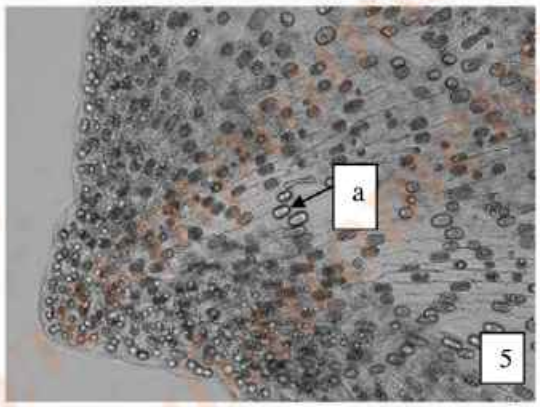
длинными одно-, двухрядными простыми, двухрядными железистыми и ветвистыми волосками; в средней части – только железистыми волосками.

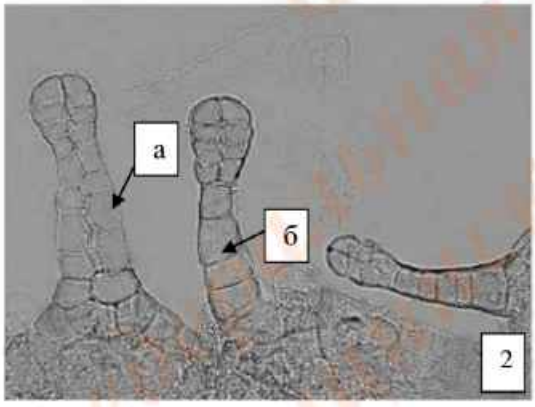
Порошок. При рассмотрении порошка должны быть видны: фрагменты эпидермиса язычковых и трубчатых цветков с удлиненными клетками и оранжевыми округлыми хромопластами; отдельные железистые волоски с двух-, четырех- или восьмиклеточной головкой и одно-, реже двухрядные простые волоски или их обломки; фрагменты тычиночных нитей, состоящих из почти квадратных клеток с утолщенными стенками; фрагменты эпидермиса густоопушенных листочков обвертки с прямыми или извилистыми стенками с устьицами и длинными одно-, двухрядными железистыми, простыми и ветвистыми волосками; мелкие друзы оксалата кальция в мезофилле; пыльца округлая и округло-трех-, четырехгранная шиповатая трех-четырехпоровая.

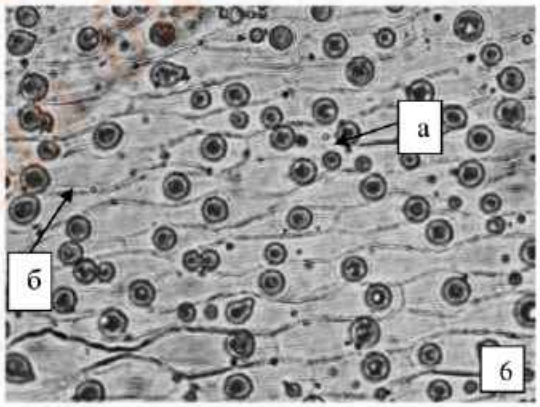
ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

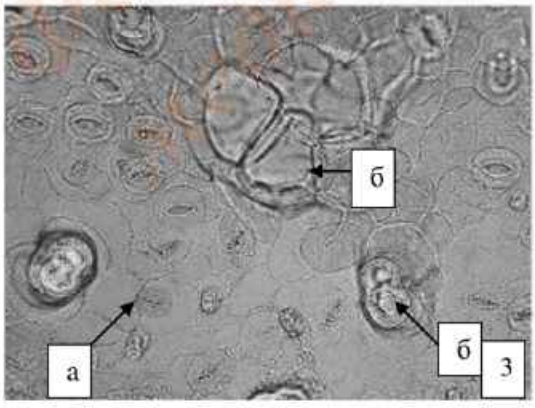

а
б
б
1


б
а
4


а
5


а
б
2


а
б
6


б
а
б
3

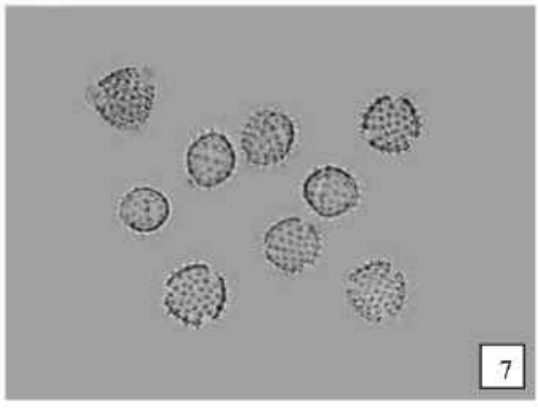

7

Рисунок – Ноготков лекарственных цветки.
1 – фрагмент эпидермиса завязи трубчатого цветка: а – простой многоклеточный двухрядный волосок, б – двухрядные железистые волоски (200×); 2 – фрагмент эпидермиса завязи язычкового цветка: а – железистый двухрядный волосок, б – железистый однорядный волосок (200×); 3 – фрагмент эпидермиса листочка обвертки: а – устьица, б – 2-3-клеточные основания обломанных волосков (200×); 4 – фрагмент зубчика венчика трубчатого цветка: а – мелкие маслянистые капли в клетках мезофилла, б – сосочковидные выросты клеток эпидермиса (200×); 5 – фрагмент зубчика отгиба язычкового цветка: а – маслянистые капли в клетках мезофилла (200×); 6 – фрагмент отгиба язычкового цветка: а – маслянистые капли в клетках мезофилла, б – складчатость кутикулы эпидермиса (400×); 7 – округлые пыльцевые зерна с шиповатой экзиной и тремя порами (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

1. Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) рутина. Около 0,005 г рутина (рутина тригидрата) растворяют в 10 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор СО хлорогеновой кислоты. Около 0,001 г хлорогеновой кислоты растворяют в 10 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор СО кофейной кислоты. Около 0,001 г кофейной кислоты растворяют в 10 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор СО β-каротина. 0,02 г СО β-каротина растворяют в хлороформе в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем раствора хлороформом до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Дифенилборилоксиэтиламина раствора 1 % в спирте 96 %. 1,0 г дифенилборилоксиэтиламина (дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира) растворяют в 100 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Полиэтиленгликоля (ПЭГ) раствора 5 % в спирте 96 %. 5 мл полиэтиленгликоля (ПЭГ) 400 смешивают со 100 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 6 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

а) Около 1,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл

спирта 70 %, нагревают с обратным холодильником на водяной бане в течение 30 мин. После охлаждения до комнатной температуры извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля на алюминиевой подложке размером 10 × 10 см в виде полос длиной 10 мм, шириной не более 3 мм наносят 20 мкл испытуемого раствора и параллельно в одну полосу 5 мкл раствора СО рутина и по 10 мкл растворов СО хлорогеновой и кофейной кислот. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре в течение 5 мин, помещают в камеру, предварительно насыщенную не менее 30 мин смесью растворителей муравьиная кислота безводная - вода - этилацетат (10:10:80) 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, выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100 – 105 °С в течение 2 – 3 мин и еще теплую обрабатывают последовательно дифенилборилоксиэтиламина раствором 1 % в спирте 96 % и полиэтиленгликоля раствором 5 % в спирте 96 %. Через 30 мин после обработки пластинку просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме растворов СО рутина, СО хлорогеновой кислоты и СО кофейной кислоты должны обнаруживаться: флуоресцирующая зона желтого, желто-оранжевого или оранжевого цвета (рутин), флуоресцирующие зоны голубого цвета (хлорогеновая кислота и выше кофейная кислота).

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться следующие зоны адсорбции: две зоны с желтой, зелено-желтой или коричнево-желтой флуоресценцией (по рутину); две зоны с голубой флуоресценцией выше зоны рутина (по возрастанию холорогеновая кислота, затем кофейная кислота); допускается обнаружение дополнительных зон.

б) Около 1,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещают в колбу вместимостью 50 мл, приливают 10 мл хлороформа, кипятят на водяной бане с обратным холодильником в течение 10 мин и охлаждают. Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр и выпаривают на кипящей водяной бане до объема 1 мл (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля на алюминиевой подложке размером 10 × 15 см наносят 30 мкл испытуемого раствора и 20 мкл раствора СО β-каротина. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в хроматографическую камеру, предварительно насыщенную в течение 1 ч смесью растворителей гексан – бензол (85:15), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры и сушат до удаления следов растворителей (в вытяжном шкафу) после чего просматривают при дневном свете.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции темного цвета на уровне зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО β-каротина; допускается обнаружение 2 дополнительных зон адсорбции желто-оранжевого цвета ниже зоны β-каротина и зоны адсорбции на старте.

2. К 2 мл раствора А испытуемого раствор (см. раздел «Количественное определение») приливают 1 мл воды, затем осторожно по стенке прибавляют 1 мл раствора ванилина в серной кислоте, на границе слоев должно наблюдаться образование окрашивания красновато-коричневого цвета в виде кольца (тритерпеновые соединения).

ИСПЫТАНИЯ

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

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 11 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 5 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 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

Остатки цветоносов, в том числе отделенные от корзинок при анализе. *Цельное сырье* – не более 6 %.

Корзинки с полностью осыпавшимися язычковыми и трубчатыми цветками (цветоложе с обвертками). *Цельное сырье* – не более 20 %.

Сырье, изменившее окраску (потемневшее и почерневшее). *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3 %.

Другие части растения (кусочки стеблей, листьев). *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3 %.

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

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

Федеральная электронная медицинская библиотека

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:* суммы флавоноидов в пересчете на рутин, – не менее 1 %; экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 70 %, – не менее 35 %; экстрактивных веществ, извлекаемых водой, – не менее 35 %.

Сумма флавоноидов

Приготовление растворов.

Раствор СО рутина. Около 0,05 г (точная навеска) рутина, предварительно высушенного при 130 – 135 °С в течение 3 ч, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и растворяют при нагревании на кипящей водяной бане в 85 мл спирта 96 %, охлаждают, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор А СО рутина). Срок годности раствора не более 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

1,0 мл раствора А СО рутина, 0,1 мл уксусной кислоты, 5 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 %, помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят спиртом 96 % до метки (раствор Б СО рутина). Срок годности раствора не более 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл спирта 70 %, колбу закрывают пробкой, взвешивают с погрешностью ± 0,01 г и оставляют на 1 ч. Затем колбу присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на кипящей водяной бане, поддерживая слабое кипение в течение 2 ч. После охлаждения колбу с содержимым вновь закрывают той же пробкой, взвешивают и содержимое колбы при необходимости восполняют растворителем. Содержимое колбы тщательно взбалтывают и фильтруют через сухой бумажный фильтр, отбрасывая первые 20 мл, в сухую колбу вместимостью 200 мл (раствор А

испытуемого раствора).

1,0 мл раствора А испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 % и 0,1 мл уксусной кислоты, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б испытуемый раствор).

Оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора измеряют через 40 мин на спектрофотометре при длине волны 408 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл раствора А испытуемого раствора, 0,1 мл уксусной кислоты, доведенный спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО рутина в таких же условиях. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1,0 мл раствора А СО рутина, 0,1 мл уксусной кислоты раствора, доведенный спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 25 \cdot a_0 \cdot 1 \cdot P \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 1 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100 \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
A_o – оптическая плотность раствора Б СО рутина;
a – навеска сырья, г;
a_o – навеска СО рутина, г;
P – содержание основного вещества в СО рутина, %;
W – влажность сырья, %.

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

$$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при длине волны 408 нм, равный 248;
a – навеска сырья, г;
W – влажность сырья, %.

Экстрактивные вещества. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1, экстрагенты – вода очищенная, спирт 70 %).

Примечание. Определение суммы флавоноидов и экстрактивных веществ, извлекаемых водой, проводят для сырья, предназначенного для производства лекарственных растительных препаратов (пачки, фильтр-пакеты); определение суммы флавоноидов и экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 70 % проводят для сырья, предназначенного для производства настойки.

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».

Федеральная электронная медицинская библиотека

Пижмы обыкновенной цветки	**ФС.2.5.0031.15**
Tanaceti vulgaris flores	**Взамен ГФ XI, вып. 2, ст. 11**

Собранные в начале цветения и высушенные соцветия (цветки) многолетнего дикорастущего травянистого растения пижмы обыкновенной – *Tanacetum vulgare* L., сем. астровых – *Asteraceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Части сложного щитковидного соцветия и отдельные цветочные корзинки. Корзинки полушаровидной формы с вдавленной серединой, диаметром 6 – 8 мм, состоят из мелких трубчатых цветков: краевых – пестичных, срединных – обоеполых. Цветоложе голое, неполое, слегка выпуклое, окружено обверткой из черепитчато расположенных ланцетных с пленчатым краем листочков. Данные листочки – простые, сидячие, перисто-раздельные, от 0,5 до 1,0 см длиной, при детальном рассмотрении заметно опушенные. Цветоносы бороздчатые, голые, реже слабоопушенные. Цвет цветков желтый, листочков обвертки – коричневато-зеленый, цветоносов – светло-зеленый. Запах своеобразный. Вкус водного извлечения пряный, горький.

Измельченное сырье. Цельные цветочные корзинки, отдельные трубчатые цветки, цветоложа и кусочки цветоносов, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.

При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны отдельные полушаровидные цветочные корзинки с вдавленной серединой и их части с трубчатыми цветками желтого цвета с многорядной черепитчатой обверткой; слегка выпуклые отдельные

цветоложа и их части.

Цвет измельченного сырья зеленовато-желтый. Запах своеобразный. Вкус водного извлечения пряный, горький.

Порошок. Смесь кусочков трубчатых цветков, листочков обвертки, цветоносов, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

Цвет порошка желтовато-зеленый с желтыми, зелеными, коричневато-зелеными, желтовато-серыми вкраплениями, изредка встречаются вкрапления темно-коричневого и зеленовато-фиолетового цвета. Запах своеобразный. Вкус водного извлечения пряный, горьковатый.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье. Измельченное сырье.* При рассмотрении листочка обвертки с поверхности должна быть видна центральная жилка, сопровождающаяся секреторными ходами; клетки эпидермиса с наружной стороны листочка крупные, с прямыми или слегка извилистыми стенками, заметна складчатость кутикулы; клетки эпидермиса с внутренней стороны узкие и сильно вытянутые. Эпидермис листочка представляет собой клетки неправильной, изодиаметричной формы с сильно утолщенными стенками, на нижнем эпидермисе имеются устьица аномоцитного типа. Эпидермис цветоложа представлен округлыми изодиаметричными клетками с темным содержимым; устьица и волоски только с наружной стороны листочка обвертки по центральной жилке и по краю: устьица окружены 4 – 6 околоустичными клетками, волоски многоклеточные, бичевидные. Клетки эпидермиса венчика – многоугольные, тонкостенные, некоторые из них имеют четковидные утолщения. На поверхности цветков имеются эфирномасличные железки, расположенные на завязи и у основания трубочки венчика. Железки 4-, 6-клеточные, двухрядные, двух-, трехъярусные. В мезофилле и клетках эпидермиса венчика встречаются друзы оксалата кальция. Эпидермис листочка обвертки с наружной стороны состоит из крупных клеток с прямыми или слегка извилистыми стенками и со складчатой кутикулой. Клетки эпидермиса с внутренней стороны листочка узкие и сильно вытянутые. При рассмотрении

листочков обвертки с поверхности заметна центральная жилка. Устьица и волоски встречаются только в эпидермисе с наружной стороны листочка. Волоски эпидермиса многоклеточные, бичевидные. Внутренний эпидермис обвертки представлен крупными клетками с тонкой оболочкой, под ним расположена паренхима в 1 – 2 слоя крупных тонкостенных клеток. Внутренний эпидермис покрыт выраженной кутикулой. Эпидермис внешней стороны обвертки отличается меньшими размерами клеток, более выраженной кутикулой.

Цветоложе состоит из губчатой паренхимы с большим количеством межклетников. Клетки губчатой паренхимы округлой изодиаметрической формы, практически бесцветны, изредка содержат хромопласты желтого цвета. Наружный слой паренхимы цветоложа содержит большое количество мелких сосудистых пучков.

Пыльники тычинок крупные вытянутые, с заостренными верхушками. Теки пыльников двухгнездные, заполненные пыльцой желтого цвета. Тычиночные нити длинные, бесцветные с заметным проводящим пучком, из 2 спиральных сосудов. Эпидермис тычиночных нитей представлен слабо вытянутыми, тонкостенными клетками. Пестик имеет 2 рыльца, поверхность которых неровная, ворсинчатая. Столбик пестика крупный, бесцветный. Паренхима завязи содержит друзы оксалата кальция. На поверхности цветков имеются эфирномасличные железки. Железки 4-, 6-клеточные, двухрядные, двух-, трехъярусные. В столбике два проводящих пучка.

Цветонос представляет собой полый стебель пучкового строения. Пучки в кольце закрытые коллатеральные с сильно выраженным слоем склеренхимы. Проводящие элементы представлены спиральными и кольчатыми сосудами.

Порошок. При исследовании порошка должны быть видны фрагменты листочков обвертки с крупными клетками эпидермиса с прямыми или слегка извилистыми стенками, складчатой кутикулой, устьицами аномоцитного типа, многоклеточными, бичевидными волосками (наружная сторона),

ГомГМУ Электронная библиотека

сосредоточенные главным образом по центральной жилке и по краю, и с узкими, сильно вытянутыми клетками эпидермиса (внешняя сторона); фрагменты эпидермиса нижней части трубки венчика трубчатого цветка, состоящего из тонкостенных изодиаметричных клеток; фрагменты эпидермиса средней части трубки венчика прозенхимной формы; фрагменты эпидермиса трубки венчика с многочисленными железистыми трихомами; фрагменты эпидермиса тычиночных нитей со слабо вытянутыми, тонкостенными клетками; фрагменты эпидермиса с эфирномасличными железками 4-, 6-клеточными, двухрядными, двух-, трехъярусными; фрагменты центральной жилки с секреторными ходами; отдельные эфирномасличные железки; мелкие друзы оксалата кальция.

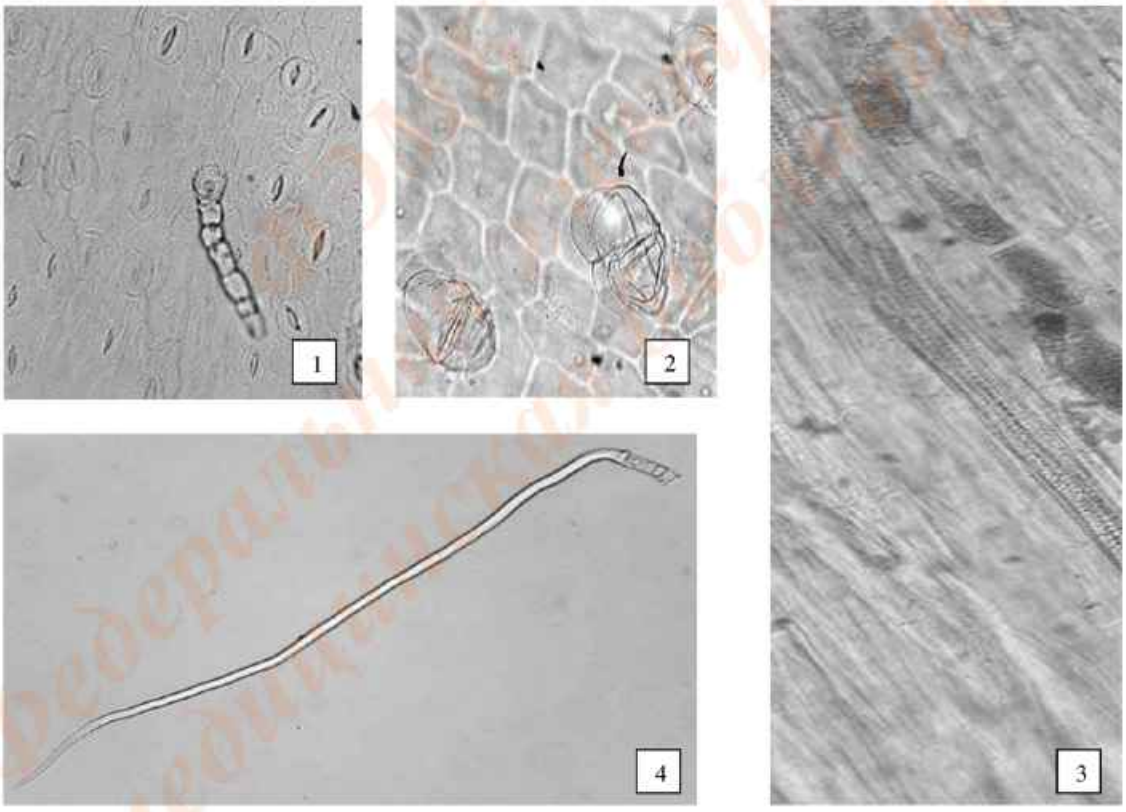


Рисунок – Пижмы обыкновенной цветки.
1 – фрагмент эпидермиса листочка обвертки: а – устьица аномоцитного типа, (200×); 2 – эфирномасличные железки (400×); 3 – секреторный ход с маслянистым содержимым вдоль центральной жилки (200×); 4 – фрагмент бичевидного волоска (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором на алюминиевой подложке размером 10 × 15 см наносят 20 мкл испытуемого раствора (см. раздел «Количественное определение» приготовление раствора А испытуемого раствора), рядом наносят 10 мкл раствора стандартного образца (СО) лютеолина (см. раздел «Количественное определение» раствор А СО лютеолина). Пластинку с нанесенными пробами сушат, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 1 ч смесью растворителей хлороформ – спирт 96% – вода (26:16:3), 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 просматривают в УФ-свете при 254 нм.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться зоны адсорбции фиолетового цвета ниже и выше зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО лютеолин-7-глюкозида.

Затем пластинку обрабатывают диазореактивом и выдерживают при 100 – 105 °С.

На хроматограмме раствора СО лютеолин-7-глюкозида должна обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией желтого или желто-оранжевого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции желтого цвета ниже зоны лютеолин-7-глюкозида; допускается обнаружение других зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 13 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 9 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 4 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 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

Цветочные корзинки и их части. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не менее 60 %, в том числе корзинки, изменившие окраску (потемневшие и почерневшие), – не более 8 %.

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: суммы флавоноидов и фенолкарбоновых кислот в пересчете на лютеолин – не менее 2,5 %.

Приготовление растворов.

Приготовление буферного раствора pH 9,0: к 900 мл раствора натрия тетрабората (0,05 моль/л) прибавляют 100 мл раствора хлористоводородной кислоты (0,1 моль/л) и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Приготовление раствора СО лютеолина: около 0,050 г (точная навеска) СО лютеолина, предварительно высушенного при температуре 105 - 110 °С в течение 2 ч, растворяют в 85 мл буферного раствора pH 9,0 в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем раствора тем же буферным раствором до метки и перемешивают (раствор А СО лютеолина). Срок годности раствора в течение 7 сут.

1,0 мл раствора А СО лютеолина, помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора до метки буферным раствором pH 9,0 и перемешивают (раствор Б СО лютеолина), готовят перед использованием.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 2,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в плоскодонную колбу с притертой пробкой вместимостью 300 мл и прибавляют 200 мл спирта 96 %. Колбу закрывают и взвешивают с погрешностью ± 0,01 г, затем присоединяют к обратному холодильнику с водяным охлаждением и нагревают на кипящей водяной бане в течение 3,5 ч. Колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и доводят массу колбы до первоначальной спиртом 96 %. Извлечение отфильтровывают через бумажный фильтр, отбрасывая первые 20 мл фильтрата. 50,0 мл фильтрата переносят в круглодонную колбу вместимостью 250 мл и отгоняют спирт под вакуумом досуха. Сухой остаток в колбе промывают 3 раза по 20 мл дихлорэтаном, насыщенным водой. Затем содержимое колбы количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл с помощью буферного раствора pH 9,0 4 раза порциями по 20 мл. Объем раствора в мерной колбе доводят до метки тем же буферным раствором и перемешивают. Содержимое колбы переносят в делительную воронку вместимостью 250 мл и очищают дихлорэтаном

4 раза порциями по 20 мл. В мерную колбу вместимостью 25 мл переносят 1,0 мл очищенного раствора, доводят объем раствора буферным раствором pH 9,0 до метки и перемешивают (раствор А испытуемого раствора).

Оптическую плотность раствора А испытуемого раствора измеряют на спектрофотометре при длине волны 310 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют буферный раствор pH 9,0. Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО лютеолина.

Содержание суммы флавоноидов и фенолкарбоновых кислот в пересчете на лютеолин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 200 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 1 \cdot P \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 50 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 50 \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot a_0 \cdot 200 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора А испытуемого раствора;
A_0 – оптическая плотность раствора Б СО лютеолина;
a – масса сырья, г;
a_0 – масса СО лютеолина, г;
W – влажность сырья, %.
P – содержание основного вещества в СО лютеолина, %.

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».

Федеральная электронная медицинская библиотека

Подорожника большого листья	**ФС.2.5.0032.15**
Plantaginis majoris folia	**Взамен ГФ XI, вып. 2, ст. 20**
	(изм. № 1 от 16.06.1999)

Собранные в период цветения и высушенные листья дикорастущего и культивируемого многолетнего травянистого растения подорожника большого – *Plantago major* L., сем. подорожниковых – *Plantaginaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Цельные или частично измельченные листья, простые, форма листа широкояйцевидная или широкоэллиптическая, у основания округлая, верхушка заостренная или притуплённая, черешок крылатый, голый, различной длины. В месте обрыва черешка видны длинные остатки нитевидных жилок. Край листа цельный или слегка зубчатый, жилкование дугонеровное; поверхность листа голая с обеих сторон, длина листьев с черешком до 24 см, ширина от 3 до 11 см. Цвет листовых пластинок от светло-зеленого до коричневато-зеленого, черешков – светло-зеленого, беловато-серого или желтовато-белого, часто с фиолетовым оттенком. Запах слабый. Вкус водного извлечения слабо-горьковатый.

Измельченное сырье. Кусочки листовых пластинок и черешков различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.

При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки листовых пластинок от светло-зеленого до коричневато-зеленого цвета с неровной поверхностью и, редко,

ФЭМБ Федеральный электронный медицинский библиотека

белесыми торчащими волосками, кусочки черешков светло-зеленого, желтовато-белого или белого цвета, часто с фиолетовым оттенком, на поперечном сечении которых могут быть видны черные дугообразные пятна (сосудисто-волокнистые пучки).

Цвет измельченного сырья от светло-зеленого до коричневато-зеленого с коричневыми, белыми, желтовато-белыми и редкими фиолетовыми вкраплениями. Запах слабый. Вкус водного извлечения слабо-горьковатый.

Порошок. Кусочки листовых пластинок и черешков различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

При рассмотрении порошка под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки листовых пластинок от светло-зеленого до коричневато-зеленого цвета с неровной поверхностью и, редко, белесыми торчащими волосками, кусочки черешков светло-зеленого, желтовато-белого или белого цвета, часто с фиолетовым оттенком, на поперечном сечении которых могут быть видны черные дугообразные пятна (сосудисто-волокнистые пучки).

Цвет порошка от светло-зеленого до коричневато-зеленого с коричневыми, белыми, желтовато-белыми и редкими фиолетовыми вкраплениями. Запах слабый. Вкус водного извлечения слегка горьковатый.

Микроскопические признаки. *Цельное и измельченное сырьё.* При рассмотрении листа с поверхности на верхней стороне листовой пластинки видны многоугольные клетки эпидермиса с прямыми боковыми стенками. Клетки нижнего эпидермиса со слабоизвилистыми стенками. Кутикула местами образует складки. Устьица на обеих сторонах листа аномоцитного типа, округлые, окружены 3 – 4 клетками эпидермиса. Встречаются простые и головчатые волоски. Простые волоски конической формы с расширенным основанием, многоклеточные, гладкие, встречаются редко, часто оборваны. Головчатые волоски 2 типов – на одноклеточной ножке с удлиненной двухклеточной головкой – встречаются по всей поверхности с обеих сторон листа, реже встречаются головчатые волоски на многоклеточной ножке с

шарообразной или овальной одноклеточной головкой. В местах прикрепления волосков клетки эпидермиса образуют розетку из 6 - 9 клеток.

Порошок. При рассмотрении микропрепаратов видны фрагменты эпидермиса верхней стороны листа из клеток с почти прямыми стенками, нижней – со слабоизвилистыми стенками; клетки эпидермиса над крупными жилками и черешка листа – продольно-вытянутые; кутикула местами складчатая; округлые устьица окружены 3 – 4 околоустьичными клетками (аномоцитный тип) – более многочисленные на нижней стороне листа; волоски – простые многоклеточные с расширенным основанием, иногда со спавшимися клетками; головчатые волоски, как правило, на одноклеточной ножке с удлиненной двухклеточной головкой и, реже, на многоклеточной ножке с шарообразной или овальной одноклеточной головкой, встречаются также головчатые волоски с 3- или 4-клеточной головкой, клетки последней часто с заостренными концами, располагаются в 2 ряда (волоски могут быть обломаны и видны только округлые места их прикрепления); в местах прикрепления волосков клетки эпидермиса образуют розетку; фрагменты черешка, в которых проводящие пучки представлены спиральными и сетчатыми сосудами в сопровождении многочисленных неодревесневших волокон.

Примечание. К другим видам подорожников, встречающимся в сырье как примесь, относят:

а) Подорожник средний (*Plantago media* L.): листовая пластинка эллиптическая, опушенная, особенно по жилкам и краю листа. Под микроскопом при рассмотрении эпидермиса видны многочисленные простые, многоклеточные волоски, не имеющие расширенного основания, с гладкой или нежно-бородавчатой поверхностью, тонкостенные, часто со спавшимися члениками. Головчатые волоски с одноклеточной ножкой и удлиненной двухклеточной головкой.

б) Подорожник ланцетный (*Plantago lanceolata* L.): листовая пластинка удлиненно-ланцетовидная, опушена по жилкам. Под микроскопом при рассмотрении эпидермиса по жилкам и краю листа встречаются заостренные, длинные, толстостенные волоски, имеющие одну короткую базальную клетку и 2 – 3 длинные конечные клетки со своеобразным их сочленением. Головчатые волоски имеют одноклеточную ножку и многоклеточную (из 8 – 10 клеток) головку.

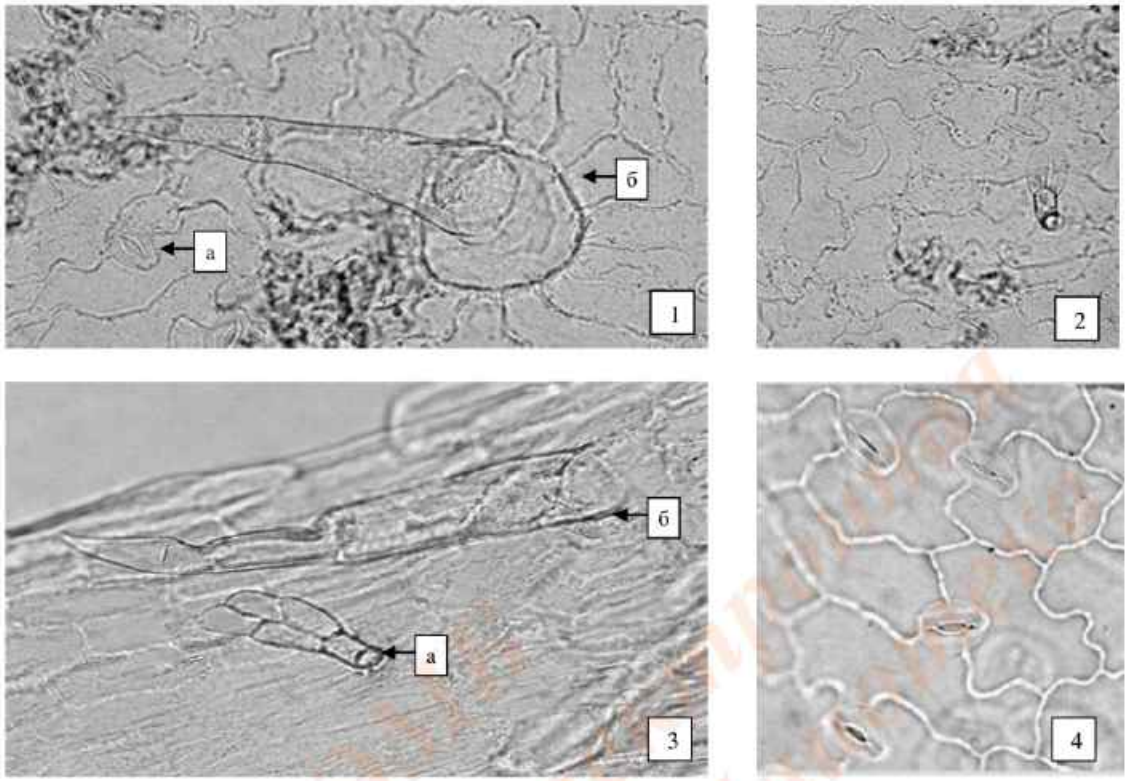


Рисунок – Подорожника большого листья.
1 – фрагмент эпидермиса нижней стороны листа: а – устьица аномоцитного типа, б – простой волосок (200×), 2 – фрагмент нижней стороны листа с головчатым волоском (200×), 3 – фрагмент эпидермиса с головчатым волоском (а) и крупным многоклеточным волоском со спавшейся клеткой (б) (200×), 4 – устьица аномоцитного типа (400×).

Определение основных групп биологически активных веществ

1. К 10 мл раствора А (см. раздел «Количественное определение. Полисахариды») прибавляют 30 мл спирта 96 % и перемешивают; появляются хлопьевидные сгустки, выпадающие в осадок при стоянии (полисахариды).

2. Раствор с осадком фильтруют через стеклянный фильтр ПОР-16, осадок с фильтра переносят в колбу вместимостью 50 мл с помощью натрия гидроксида раствора 0,1 М. К 1 мл полученного раствора прибавляют 0,25 мл карбазола раствора 0,5 % и 5 мл серной кислоты концентрированной, перемешивают и нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 мин; появляется красно-фиолетовое окрашивание (галактуроновая кислота).

ИСПЫТАНИЯ

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

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 20 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 6 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 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

Листья, изменившие окраску (потемневшие и почерневшие). *Цельное сырье* – не более 5 %.

Кусочки листьев, изменивших окраску (потемневшие и почерневшие). *Измельченное сырье* – не более 5 %.

Цветочные стрелки. *Цельное сырье* – не более 1 %.

Кусочки цветочных стрелок. *Измельченное сырье* – не более 1 %.

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

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

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

Федеральная электронная медицинская библиотека

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 сырьё, измельченное сырье, порошок:* полисахаридов – не менее 12 %; экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 70 %, – не менее 20 %.

Полисахариды.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Около 10,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 500 мл, прибавляют 200 мл воды очищенной, нагретой до кипения. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и кипятят при перемешивании на электрической плитке в течение 30 мин. Экстракцию повторяют ещё 2 раза, используя по 200 и 100 мл воды соответственно.

Водные извлечения объединяют и фильтруют в мерную колбу вместимостью 500 мл через 5 слоёв марли, вложенной в стеклянную воронку и предварительно промытой водой очищенной. Фильтр промывают водой и доводят объём раствора тем же растворителем до метки (раствор А).

25,0 мл раствора А помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 75 мл спирта 96 %, перемешивают, подогревают на водяной бане в течение 30 мин. Содержимое колбы фильтруют через предварительно высушенный и взвешенный беззольный бумажный фильтр. Осадок на фильтре последовательно промывают 15 мл раствора спирта 96 % в воде очищенной (3:1), 10 мл смеси этилацетата и спирта 96 % (1:1). Фильтр с осадком сушат сначала на воздухе, затем при температуре 100 – 105 °С до постоянной массы.

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

$$X = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 500 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot 25 \cdot (100 - W)},$$

где m_1 – вес фильтра, г;
m_2 – вес фильтра с осадком, г;
a – навеска сырья, г;
W – влажность сырья, %.

Экстрактивные вещества. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье» (метод 1, из навески сырья 1,0 г, сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, экстрагент – спирт 70 %).

Примечание. Определение полисахаридов проводят для сырья, предназначенного для производства лекарственных растительных препаратов (пачки, фильтр-пакеты); определение экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 70 %, проводят для сырья, предназначенного для производства настойки, экстракта.

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».

ФГБУ Федеральная электронная медицинская библиотека

Полыни горькой трава	**ФС.2.5.0033.15**
Artemisiae absinthii herba	**Взамен ГФ XI, вып. 2, ст. 44**

Собранная в начале цветения и высушенная трава дикорастущего многолетнего травянистого растения полыни горькой – *Artemisia absinthium* L., сем. астровых – *Asteraceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Цельные или частично измельченные верхушки цветоносных стеблей длиной не более 25 см. Стебли цилиндрические, слегка ребристые, иногда ветвистые, заканчивающиеся облиственной раскидистой сложной метелкой, веточки которой несут мелкие корзинки диаметром 2,5 – 4 мм. Верхние прицветные листья сидячие, ланцетные или продолговатые, ниже на цветоносе листья тройчато-раздельные, край листа цельный, жилкование перистое, листья густо опушены короткими волосками с обеих сторон.

Цветки собраны в шаровидные поникающие корзинки, образующие метелку. Обертка черепитчатая, двухрядная, наружные листочки линейные, снаружи шерстистые, внутренние – широкоэллиптические, тупые, пленчатые. Цветки мелкие, наружные трубчатые – пестичные, внутренние воронковидные – обоеполые. Цветоложе выпуклое, усажено узкими, белыми пленчатыми прицветниками. Цвет стеблей – зеленовато-серый, листьев сверху – серовато-зеленый, снизу – серебристо-серый, цветков – желтый. Запах ароматный, своеобразный, сильный. Вкус водного извлечения пряно-горький.

Измельченное сырье. Кусочки стеблей, листьев, соцветий, проходящие

сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет стеблей зеленовато-серый, листьев - серебристо-серый, соцветий – желтый. Запах ароматный, своеобразный, сильный. Вкус водного извлечения пряно-горький.

Порошок. При рассматривании сырья под лупой (10×) и стереомикроскопом (16×) видна смесь кусочков травы зеленовато-серого цвета с желтыми вкраплениями, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Запах ароматный, своеобразный, сильный. Вкус водного извлечения пряно-горький.

Микроскопические признаки. *Цельное и измельченное сырье.* При рассмотрении микропрепаратов с поверхности верхней стороны листовой пластинки видны извилистые клетки эпидермиса. Клетки нижнего эпидермиса – с более извилистыми стенками. Устьица расположены на верхней и нижней сторонах листа.

Устьица овальные, мелкие, аномоцитного устьичного типа, окруженные 3 – 5 клетками. Волоски простые, многоклеточные, Т-образные, состоящие из короткой 2–4-клеточной ножки, несущей длинную тонкостенную клетку с заостренными концами, прикрепленную к ножке посередине и лежащую горизонтально. Места прикрепления волосков имеют вид круглых валиков. На обеих сторонах листа расположены крупные, овальные эфирномасличные железки с поперечной перегородкой, сидящие в углублениях. По краям и в разрезе железок видно, что они состоят из 8 (реже 6) выделительных клеток, расположенных в 2 ряда и 4 яруса, на короткой одноклеточной ножке. Палисадная ткань однорядная, расположена по обеим сторонам листа, губчатая – из округлых тонкостенных клеток с большими межклетными пространствами.

Эпидермис цветков имеет прямоугольные клетки с мелкоизвилистыми стенками, пыльца округлая, мелкоячеистая. Цветоложе густо опушено простыми мечевидными волосками. Волоски в основании имеют 2 – 4 мелкие продолговатые клетки с тонкими стенками, конечная клетка длинная, у основания узкая, затем расширяющаяся, с толстыми стенками, слегка

извилистая, часто отламывается. Основание волосков железистое. Эфирномасличные вместилища многочисленные, схизогенные, округлые или овальные. Эпидермис стебля состоит из прямостенных клеток.

Порошок. При рассмотрении микропрепаратов порошка видны обрывки извилистостенных клеток эпидермиса, Т-образных волосков, овальные эфирномасличные железки с поперечной перегородкой, округлая мелкоячеистая пыльца, обрывки мечевидных волосков и схизогенных вместилищ.

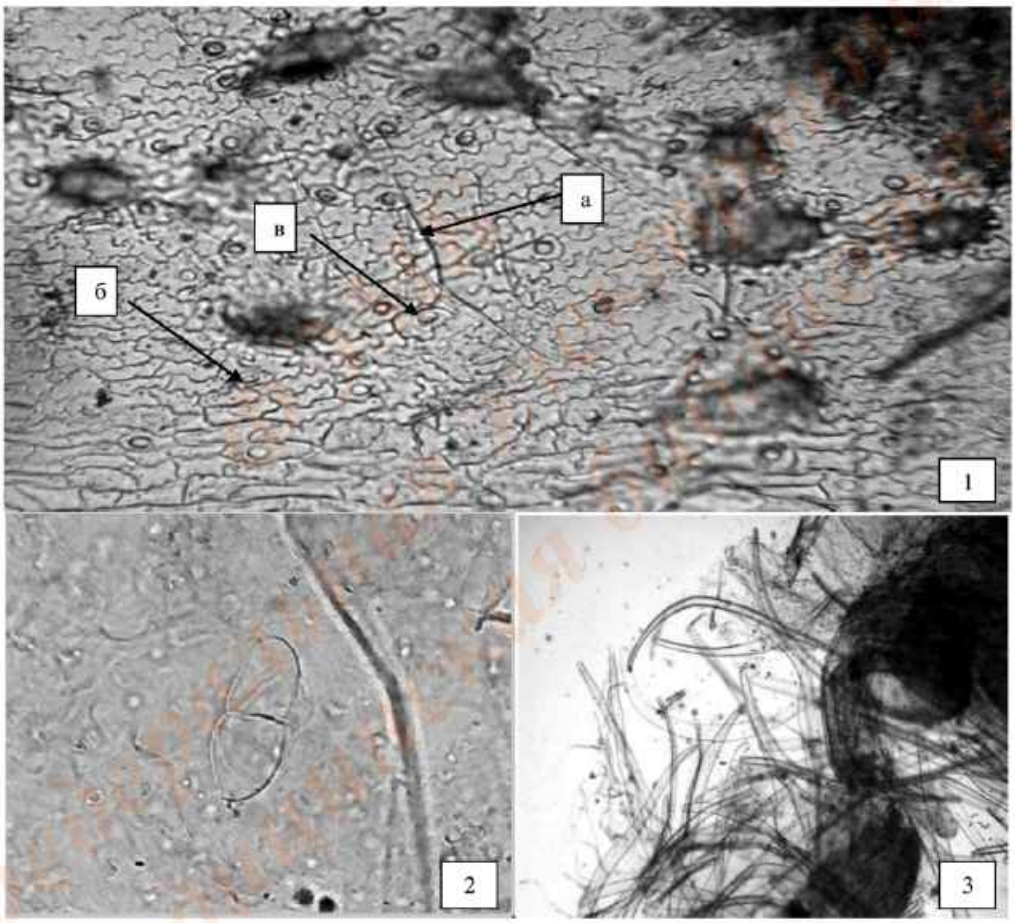


Рисунок – Полыни горькой трава (400×).
1 – верхняя сторона листа: а – Т-образные волоски с двухклеточными основаниями, б – извилистые стенки эпидермиса, в – округлые места прикрепления волосков; 2 – эфиромасличная железка (вид сверху); 3 – опушение простыми мечевидными волосками

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) рутина. Около 0,001 г рутина (рутина тригидрата) растворяют в 10 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор СО хлорогеновой кислоты. Около 0,001 г хлорогеновой кислоты растворяют в 10 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Дифенилборилоксиэтиламина раствора 1 % в спирте 96 %. 1,0 г дифенилборилоксиэтиламина (дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира) растворяют в 100 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Полиэтиленгликоля (ПЭГ) раствора 5 % в спирте 96 %. 5 мл полиэтиленгликоля (ПЭГ) 400 смешивают со 100 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 6 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

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

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля на алюминиевой подложке размером 10 × 10 см в виде полос длиной 10 мм, шириной не более 3 мм наносят 30 мкл испытуемого раствора и параллельно в одну полосу по 10 мкл растворов СО рутина и хлорогеновой кислоты. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре в течение 5 мин, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 30 мин смесью растворителей этилацетат - муравьиная кислота безводная - вода (40:4:6) 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 в вытяжном шкафу. Далее пластинку нагревают в сушильном шкафу 2 - 3 мин при 100 - 105 ºС и еще теплую обрабатывают

последовательно дифенилборилоксиэтиламина раствором 1 % в спирте 96 % и полиэтиленгликоля раствором 5 % в спирте 96 % .

Через 30 мин после обработки пластинку рассматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме растворов СО рутина и СО хлорогеновой кислоты должны обнаруживаться: зона желтого, желто-оранжевого или оранжевого цвета (рутин), и зона голубого цвета (хлорогеновая кислота).

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться следующие зоныадсорбции: зона желтого, желто-зеленого, желто-оранжевого или оранжевого цвета на уровне зоны рутина; две зоны голубого цвета – на уровне зоны СО хлорогеновой кислоты и выше нее; допускается обнаружение дополнительных зон.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 13 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 13 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 3 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, – не более 3 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 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

Части, изменившие окраску (потемневшие и почерневшие). *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3 %.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

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

Органическая примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 2 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 1,5 %.

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:* сумма флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 0,3 %; эфирного масла – не менее 0,2 %, экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 70 %, – не менее 20 %.

Сумма флавоноидов

Приготовление растворов.

Раствор СО рутина. Около 0,05 г (точная навеска) рутина, предварительно высушенного при 130 – 135 °С в течение 3 ч, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и растворяют при нагревании на кипящей водяной бане в 85 мл спирта 96 %, охлаждают, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор А СО рутина). Срок годности раствора не более 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

2,0 мл раствора А СО рутина, 4 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 % и 1 каплю уксусной кислоты разведенной 30 %, помещенных в мерную колбу вместимостью 25 мл доведенных спиртом 96 % до метки

(раствор Б СО рутина). Срок годности раствора не более 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих через сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 60 мл спирта 70 %. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Горячее извлечение фильтруют через бумажный складчатый фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. После охлаждения фильтр промывают 40 мл спирта 70 %, объем извлечения доводят до метки и перемешивают (раствор А испытуемого раствора).

2,0 мл раствора А испытуемого раствора, помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 4 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 %, 1 каплю уксусной кислоты разведенной 30 %, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора).

Оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора измеряют через 30 мин на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2 мл раствора А испытуемого раствора и 1 капли уксусной кислоты разведенной 30 % доведенный спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО рутина в таких же условиях. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2 мл раствора А СО рутина, 1 капли уксусной кислоты разведенной 30 %, доведенный спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 2 \cdot 100 \cdot 25 \cdot P \cdot 100}{A_0 \cdot 100 \cdot 25 \cdot a \cdot 2 \cdot 100 \cdot (100 - W)} \cdot 100,$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
A_o – оптическая плотность раствора Б СО рутина;
a – навеска сырья, г;
a_o – навеска СО рутина, г;
P – содержание основного вещества в СО рутина, %;
W – влажность сырья, %.

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

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 2 \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при длине волны 410 нм, равный 260;
a – навеска сырья, г;
W – влажность сырья, %.

Экстрактивные вещества. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1, экстрагент – спирт 70 %).

Эфирные масла. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 2, из навески 20,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, время перегонки - 3 ч).

Примечание. Определение суммы флавоноидов в пересчете на рутин проводят в сырье, предназначенном для получения лекарственных растительных препаратов (пачки, фильтр-пакеты); эфирного масла и экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 70 %, – в сырье, предназначенном для получения настоек.

Электронная медицинская библиотека

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».

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Пустырника трава	**ФС.2.5.0034.15**
Leonuri herba	**Взамен ГФ XI, вып. 2, ст. 54**
	(изм. № 5 от 16.06.1999)

Собранная в фазу начала цветения и высушенная трава дикорастущего и культивируемого травянистого растения пустырника пятилопастного – *Leonurus quinquelobatus Gilib*. и пустырника сердечного (пустырника обыкновенного) – *Leonurus cardiaca* L. (*L. cardiaca*, *L. subsp. villosus (Desf.) Jav*.), сем. яснотковых – *Lamiaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Верхние части стеблей, длиной до 40 см с цветками и листьями, могут встречаться отдельные листья, цветки, части соцветий и стеблей. Стебель четырехгранный, опушенный, или опушение только по ребрам, полый, толщиной до 0,5 см. Листья супротивные, нижние – трех-, пятилопастные или раздельные, в соцветиях – трехлопастные или ланцетовидные, зубчатые или цельнокрайние с клиновидным основанием, длиной до 14 см, шириной до 10 см. Соцветия колосовидные, прерванные; цветки и бутоны собраны в мутовки по 10 – 20 в пазухах листьев. Чашечка трубчато-колокольчатая с 5 шиловидно-заостренными зубцами, коническая, колючая. Венчик длиной до 0,12 см, двугубый, длиннее чашечки, верхняя губа цельнокрайняя, нижняя – трехлопастная; тычинок 4; завязь нижняя. Стебли, листья, чашечки цветков опушены волосками.

Цвет стеблей серовато-зеленый, коричневато-зеленый, листьев – темно-зеленый, серовато-зеленый, чашелистиков – зеленый, венчиков – серовато-

Федеральный ЭМБ электронной медицинской библиотеки

розовый или розовато-фиолетовый. Запах слабый. Вкус водного извлечения горьковатый.

Измельченное сырье. Кусочки стеблей, листьев, соцветий, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.

При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки стебля, четырехгранного или (чаще) расщепленного с опушенной (для пустырника сердечного слабоопушенной) серовато-зеленой, коричневато-зеленой поверхностью; кусочки листьев – темно-зеленые, серовато-зеленые, сильно опушенные; цветки или их части: чашечка трубчато-колокольчатая, опушенная, с колючими зубцами, венчик двугубый серовато-розовый или розовато-фиолетовый, опушенный снаружи.

Цвет измельченного сырья серовато-зеленый. Запах слабый. Вкус водного извлечения горьковатый.

Порошок. Кусочки стеблей, цветоносов, листьев и соцветий, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

При рассмотрении порошка под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки серовато-зеленого стебля, опушенного волосками с поверхности и беловатого или желтовато-белого на изломе; зеленые частицы опушенных листьев и чашечки, фрагменты опушенного серовато-розового или розово-фиолетового венчика.

Цвет порошка от серовато-зеленого до коричневато-зеленого с многочисленными беловатыми, желтовато-белыми, серовато-белыми, розово-фиолетовыми и серовато-розовыми вкраплениями. Запах слабый. Вкус водного извлечения горьковатый.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье, измельченное сырье.* При рассмотрении препаратов листа с поверхности с обеих сторон должны быть видны клетки эпидермиса с тонкими извилистыми боковыми стенками. Многочисленные устьица присутствуют на нижней стороне и сопровождаются 3 – 4 (редко 2) околоустьичными клетками (аномоцитный

тип). На обеих сторонах листа встречаются многочисленные простые многоклеточные волоски с бородавчатой поверхностью, состоящие из 2 – 5 клеток, расширенные в местах сочленения, и редкие простые одноклеточные волоски, а также головчатые волоски на одно-, двухклеточной короткой ножке с округлой головкой, состоящей из 1 - 2 клеток. Преимущественно на нижней стороне листа расположены эфирномасличные железки, состоящие из 4 – 6 (реже 8) выделительных клеток на короткой ножке.

Венчик цветка с внешней стороны густо покрыт волосками. Эпидермис верхней губы венчика состоит из клеток удлиненной формы (внешняя сторона) и более мелких клеток изодиаметрической формы (внутренняя сторона) с извилистыми стенками. На внешней стороне верхней губы находятся волоски, простые одноклеточные и многоклеточные, состоящие из 2 – 6 (реже 8) клеток, с бородавчатой поверхностью, а также головчатые волоски. Присутствуют эфирномасличные железки. Большое количество простых одноклеточных и многоклеточных бородавчатых волосков обнаруживается по краю верхней губы. С внутренней стороны встречаются редкие простые одноклеточные и многоклеточные волоски, состоящие из 2 – 4 клеток, а также головчатые волоски. Эпидермис лопастей нижней губы венчика состоит из клеток изодиаметрической формы с прямыми стенками. На внешней стороне волоски простые одноклеточные, часто изогнутые, многоклеточные – из 2 – 3 клеток, головчатые волоски и эфирномасличные железки. Волоски на внутренней стороне преимущественно простые одноклеточные с бородавчатой поверхностью и головчатые. Около края и по краю нижней губы с обеих сторон волосков и железок не обнаруживается. В мезофилле присутствуют мелкие друзы оксалата кальция. Клетки эпидермиса трубки венчика с обеих сторон имеют удлиненную или изодиаметрическую форму и прямые стенки. На внешней стороне трубки представлены простые одноклеточные и многоклеточные волоски, состоящие из 2 – 3 клеток, часто изогнутых, а также головчатые волоски. Обнаруживаются эфирномасличные железки. На внутренней стороне трубки в верхней части присутствуют

редкие простые волоски, состоящие из 1 – 2 клеток, а также головчатые волоски и эфирномасличные железки, а в центральной части – значительное количество простых одноклеточных, часто изогнутых тонкостенных волосков.

Клетки эпидермиса чашелистика с 2 сторон имеют удлиненно-вытянутую или изодиаметрическую форму с извилистыми или слабо извилистыми стенками. На внешней стороне присутствуют устьица аномоцитного типа и множество волосков, простых одноклеточных и многоклеточных с бородавчатой поверхностью, а также головчатые волоски. Простые многоклеточные волоски состоят из 2 – 6 клеток и в значительном количестве обнаруживаются на верхушке чашелистика и по краю зубца; в основании, а также в центральной части и по ходу жилок присутствует большое количество механических волокон. На внутренней стороне чашелистика встречаются волоски, простые бородавчатые одноклеточные и многоклеточные, состоящие из 2 – 5 клеток, а также головчатые волоски и эфирномасличные железки. Пыльца округлая, трехгранная гладкая трехбороздная.

При рассмотрении давленого препарата цветоножки и стебля хорошо видны клетки эпидермиса изодиаметрической или удлиненно-прямоугольной формы с прямыми стенками; обнаруживаются основные диагностические признаки (тип устьичного аппарата, волоски, эфирномасличные железки), характерные для листа пустырника; в состав проводящих пучков входят спиральные, лестничные и сетчатые сосуды.

Порошок. В порошке видны фрагменты эпидермиса с устьицами, простыми одноклеточными и многоклеточными волосками с бородавчатой поверхностью; эфирномасличные железки, состоящие из 4 – 6 выделительных клеток и одноклеточной ножки; пыльца округлая, трехгранная гладкая трехбороздная. Обнаруживаются также фрагменты стебля и цветка, содержащие основные диагностические признаки (тип устьичного аппарата, волоски, железки), характерные для листа пустырника.

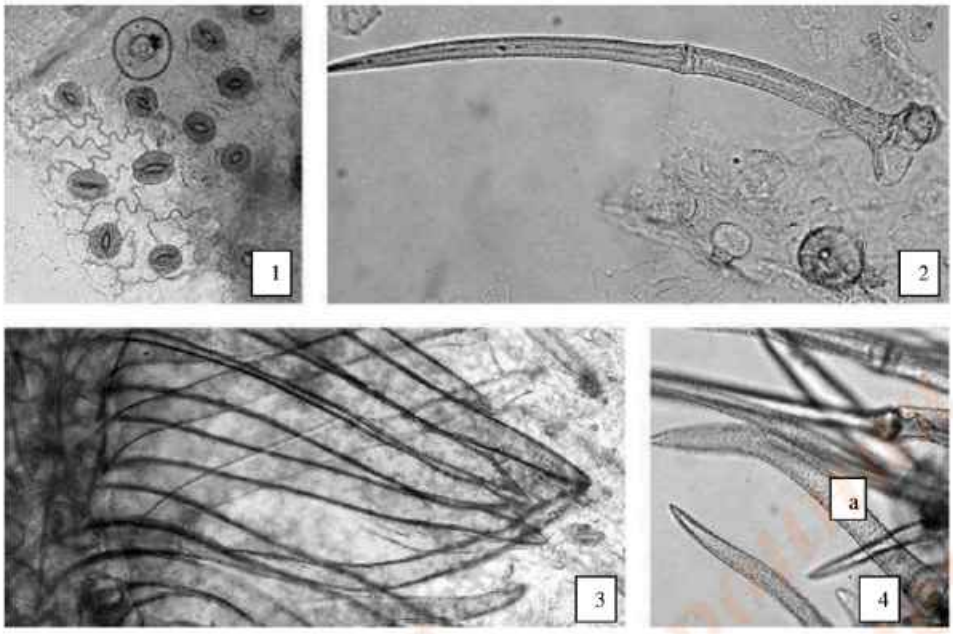


Рисунок – Пустырника трава.
1 – фрагмент эпидермиса (нижняя сторона) с извилистыми стенками, устьицами аномоцитного типа, эфирномасличной железкой (200×), 2 – простой многоклеточный бородавчатый волосок и головчатый волосок (200×), 3 – фрагмент трубки венчика цветка с простыми одноклеточными тонкостенными волосками (200×), 4 – фрагмент верхней губы венчика цветка: а – простой одноклеточный грубобородавчатый волосок (200×)

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов

Раствор стандартного образца (СО) метилового красного. Около 0,002 г метилового красного растворяют в 10 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 6 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор СО суданакрасного G. Около 0,0025 г судана красного G растворяют в 10 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 6 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около 1,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл спирта 70 % и нагревают при температуре (40±5) °С, постоянно перемешивая, в течение 30 мин. После

охлаждения до комнатной температуры полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля на полимерной подложке размером 10 × 10 см в виде полос длиной 10 мм, шириной не более 3 мм наносят 20 мкл испытуемого раствора и по 5 мкл раствора СО метилового красного и раствора СО судана красного G (растворы СО можно наносить в одну полосу). Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре в течение 10 мин, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 30 мин смесью растворителей толуол – этилацетат – уксусная кислота ледяная (70:25:5) 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 диметиламинобензальдегида раствором 2 %.

Пластинку просматривают при дневном свете. При необходимости слегка подогревают при температуре около 80 °С в течение 2 - 3 мин.

На хроматограмме растворов СО метилового красного и СО судана красного G должны обнаруживаться: зона розового или красного цвета (метиловый красный), и зона красного или коричневато-красного цвета (судан красный G).

На хроматограмме испытуемого раствора практически сразу появляются зоны иридоидов розового цвета выше зоны СО метилового красного (возможно присутствие зоны того же цвета ниже зоны метилового красного) быстро переходящие в зоны серовато-синего цвета; допускается обнаружение дополнительных зон.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 13 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 12 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 6 %.

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 7 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 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

Сырье, изменившее окраску (потемневшее и почерневшее). *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 7 %.

Стебли. *Цельное сырье* – не более 46 %.

Кусочки стеблей. *Измельченное сырье* – не более 46 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3 %.

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

Тяжелые металлы. Определение проводят согласно ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радиоактивность. Определение проводят согласно ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. Определение проводят согласно требованиям ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. Определение проводят согласно ОФС

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

«Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок:* сумма флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 0,2 %; экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 70 %, – не менее 15 %.

Сумма флавоноидов

Аналитическую пробу сырь измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм. Около 2,5 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл спирта 70 %, колбу закрывают пробкой, взвешивают с погрешностью $\pm$ 0,01 г и оставляют на 1 ч. Затем колбу соединяют с обратным холодильником, нагревают на водяной бане, поддерживая слабое кипение в течение 1 ч. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры, взвешивают, при необходимости доводят ее содержимое до первоначальной массы спиртом 70 %. Содержимое колбы фильтруют через бумажный складчатый фильтр, отбрасывая первые 25 мл фильтрата (раствор А).

2,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 % и доводят объем раствора до метки спиртом 96 %, перемешивают (раствор Б). Через 30 мин измеряют оптическую плотность раствора Б на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2 мл раствора А, 0,1 мл уксусной кислоты ледяной доведенный спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 2 \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б;

$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия

хлоридом при длине волны 410 нм, равный 260;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %

Экстрактивные вещества. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1 из навески 1,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, экстрагент спирт 70 %).

Примечание. Определение суммы флавоноидов в пересчете на рутин проводят в сырье, предназначенном для производства лекарственных растительных препаратов (пачки, фильтр-пакеты); определение экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 70 %, проводят для сырья, предназначенного для производства экстрактов.

Упаковка, маркировка и транспортирование. Осуществляется в соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья».

Хранение. Хранение ЛРС осуществляется в соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Федеральная электронная медицинская библиотека

Расторопши пятнистой плоды	**ФС.2.5.0035.15**
Silybi mariani fructus	**Взамен ВФС 42-3380-99**

Собранные зрелые и высушенные плоды культивируемого растения расторопши пятнистой – *Silybum marianum.* (L.) *Gaertn*., сем. астровых – *Asteraceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Плоды – семянки яйцевидной формы, слегка сдавленные с боков, длиной от 5 до 8 мм, шириной от 2 до 4 мм. Верхушка косоусеченная с выступающим тупым толстым остатком столбика и островершинным валиком вокруг него или без остатка столбика. Основание семянки тупое, рубчик щелевидный или округлый. Поверхность гладкая, иногда, продольно морщинистая, блестящая или матовая, часто пятнистая. На поперечном срезе плода под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны перикарпий, плотно сомкнутый с семенной кожурой, и 2 семядоли зародыша. Цвет от черного до светло-коричневого, иногда с сиреневым оттенком, валик более светлый. Запах слабый. Вкус водного извлечения слегка горьковатый.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* На поперечном и продольном срезах семянки должны быть видны семядоли, окруженные толстым слоем плотно сросшихся склереид, заметных по естественной желтой окраске. На поперечном срезе перикарпия видны слоя кутикулы, покрывающей неоднородный эпидермис, который со стороны основания семянки представлен небольшими толстостенными слабо-пористыми клетками, со стороны верхушки семянки переходящий в вытянутые

Федеральная электронная медицинская библиотека

толстостенные клетки, покрытые толстым слоем кутикулы. Устьица в эпидермисе плода отсутствуют. Непосредственно за эпидермисом расположен пигментный слой в 1 ряд тонкостенных, рыхлых клеток с бурым содержимым. За ним следует слой волокнистых клеток мезокарпия от 1 до 10 рядов, окрашиваемых сернокислым анилином в желтый цвет. Далее за слоем волокнистых клеток расположена семенная кожура, представленная мощным слоем склереид вытянутой формы с утолщенными стенками. За слоем склереид, в оболочке семянки, расположена паренхима плода, представленная полуразрушенными спавшимися клетками. Кожура сросшаяся с паренхимой внутренней части плода и состоит из нескольких рядов спавшихся клеток паренхимы семенной кожуры, а также спаянного с ней остатка эндосперма, представленного одним рядом крупных клеток, заполненных алейроновыми зернами. Основную массу семени составляют крупные семядоли, выполненные тонкостенными клетками запасающей паренхимы (вытянутой формы).

Клетки семядолей содержат жирное масло и алейроновые зерна округлой формы. В клетках запасающей паренхимы часто встречаются мелкие друзы оксалата кальция.

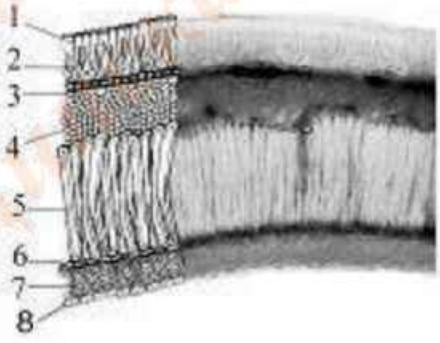


Рисунок – Расторопши пятнистой плод. Поперечный срез кожуры.
1 – кутикула, 2 – палисадоподобно вытянутые клетки эпидермиса, 3 – пигментный слой, 4 – волокнистые клетки, 5 – склереиды, 6 – спавшиеся клетки паренхимы плода, 7 – спавшиеся клетки паренхимы семенной кожуры, 8 – остаток эндосперма (100×)

Федеральный ЭМУМБ медицинская электронная библиотека

Определение основных биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Около 1,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещают в колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 10 мл спирта 96 % и нагревают с обратным холодильником при умеренном кипении на водяной бане в течение 30 мин. Извлечение охлаждают и фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором на алюминиевой подложке размером 10 × 15 см наносят 10 мкл испытуемого раствора и рядом 20 мкл раствора стандартного образца (СО) силибина (см. раздел «Количественное определение» приготовление раствора А СО силибина). Пластинку с нанесенными пробами сушат, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 2 ч смесью растворителей углерод четыреххлористый – ацетонитрил (6:4), 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 просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции фиолетового цвета на уровне зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО силибина, допускается обнаружение других зон адсорбции.

Хроматограмму обрабатывают свежеприготовленным диазореактивом, выдерживают в сушильном шкафу при температуре 105 °С в течение 5 мин. На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции на уровне зоны адсорбции СО силибина; допускается наличие других зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье* – не более 12 %.

Зола общая. *Цельное сырье* – не более 6 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье* – не более 4 %.

Посторонние примеси

Другие части сырья. *Цельное сырье* – не более 2 %.

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

Минеральная примесь. *Цельное сырье* – 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:* сумма флаволигнанов в пересчете на силибин – не менее 2,4 %, жирного масла – не менее 15 %, экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 80 %, – не менее 4 %.

Сумма флаволигнанов

Приготовление растворов.

Раствор СО силибина. Около 0,02 г (точная навеска) СО силибина растворяют в мерной колбе вместимостью 100 мл в 80 мл спирта 96 %, при нагревании на водяной бане при температуре от 70 до 80 °С. Раствор охлаждают, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор А СО силибина). Срок годности раствора 30 сут.

1,0 мл раствора А СО силибина переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и

перемешивают (раствор Б СО силибина). Срок годности раствора 30 сут.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл и прибавляют 50 мл спирта 96 %. Колбу с содержимым присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Затем содержимое колбы охлаждают до комнатной температуры и фильтруют через бумажный фильтр с красной полосой в мерную колбу вместимостью 200 мл. Извлечение повторяют еще 2 раза вышеуказанным способом, после охлаждения фильтрата доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор А испытуемого раствора).

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

Оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора измеряют на спектрофотометре при длине волны 289 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют спирт 96 %.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО силибина в таких же условиях.

Содержание суммы флаволигнанов в пересчете на силибин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 25 \cdot 200 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 100 \cdot \mathrm{P}}{A_0 \cdot a \cdot 25 \cdot 1 \cdot 100 \cdot (100 - W) \cdot 100},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
A_0 – оптическая плотность раствора Б СО силибина;
a – навеска сырья, г;
a_0 – навеска СО силибина, г;
P – содержание основного вещества в СО силибина, %;
W – влажность сырья, %.

Допускается содержания суммы флаволигнанов в пересчете на силибин

вычислять с использованием величины удельного показателя поглощения силибина по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 200 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1см}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
$A_{1см}^{1\%}$ – удельного показателя поглощения раствора силибина при длине волны 289 нм, равный 450;
a – навеска сырья, г;
W – влажность сырья, %.

Жирное масло

Около 5,0 г (точная навеска) сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещают в пакет из фильтровальной бумаги. Пакет предварительно обезжиривают в аппарате Сокслета петролейным эфиром ($t_{кип}$ 40 – 70 °С), сушат в сушильном шкафу при температуре 80 °С в течение 2 ч, охлаждают в эксикаторе над кальция хлоридом безводным в течение 30 мин, взвешивают, помещают в аппарат Сокслета и заливают петролейным эфиром ($t_{кип}$ 40 – 70 °С) в количестве, равном 2 объемам экстрактора.

Экстракцию проводят на водяной бане при температуре около 80 °С (3 – 4 слива в 1 ч) в течение 12 ч. Затем пакет вынимают и оставляют в вытяжном шкафу до полного удаления эфира, после чего сушат в сушильном шкафу при температуре 80 °С в течение 2 ч и после охлаждения в эксикаторе взвешивают на аналитических весах.

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

$$X = \frac{(a_1 - a_2) \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot (100 - W)},$$

где a – навеска сырья до экстракции, г;
a_1 – навеска сырья с пакетом до экстракции, г;
a_2 – навеска сырья с пакетом после экстракции, г;
W – влажность сырья, %.

Экстрактивные вещества. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1, экстрагент – спирт 80 %).

Примечание. Определение суммы флаволигнанов проводится для сырья, предназначенного для производства лекарственных растительных препаратов (пачки, фильтр-пакеты) и экстрактов; определение экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 80 %, проводится для сырья, предназначенного для производства экстрактов, определение жирного масла – для сырья, предназначенного для получения жирного масла.

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».

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Родиолы розовой корневища и корни	**ФС.2.5.0036.15**
Rhodiolae roseae rhizomata et radices	**Взамен ГФ XI, вып. 2, ст. 75**

Собранные в фазу цветения и плодоношения, очищенные и отмытые от земли, разрезанные на куски и высушенные корневища и корни многолетнего дикорастущего или культивируемого травянистого растения родиолы розовой – *Rhodiola rosea* L., сем. толстянковых – *Crassulaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Куски корневищ и корней различной формы. Куски корневищ длиной до 9 см, толщиной 2 – 5 см, твердые, морщинистые, со следами отмерших стеблей и остатками чешуевидных листьев. От корневища отходят немногочисленные корни длиной 2 – 9 см, толщиной 0,5 – 1 см. Поверхность корневища и корня блестящая, серовато-коричневого цвета; при отслаивании пробки обнаруживается золотисто-желтый слой. Цвет на изломе коричнево-розовый, розовато-коричневый или светло-коричневый. Запах специфический. Вкус водного извлечения горьковато-вяжущий.

Измельченное сырье. Кусочки корневищ и корней различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет коричнево-розовый или розово-коричневый с бело-розовыми, светло-желтыми, темно-коричневыми и коричневыми вкраплениями. Запах специфический. Вкус водного извлечения горьковато-вяжущий.

Порошок. Кусочки корневищ и корней различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Цвет коричнево-розовый или розово-коричневый с бело-розовыми, светло-желтыми, желтовато-розовыми,

желтыми, темно-коричневыми и коричневыми вкраплениями. Запах специфический. Вкус водного извлечения горьковато-вяжущий.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении микропрепаратов поперечного среза корневища должна быть видна слоистая перидерма. Корневище имеет пучковый тип строения. Проводящие пучки открытые, коллатеральные, веретеновидные, расположены кольцом, ориентированы к периферии корневища флоэмой и к центру – ксилемой. Возможно наличие второго кольца более мелких проводящих пучков, в которых флоэма ориентирована к центру, а ксилема – к периферии. Помимо сосудов и трахеид проводящего пучка могут встречаться очень узкие и короткие спиральные и кольчатые трахеиды, лежащие в межклетниках. Паренхима корневища состоит из крупных клеток, заполненных крахмалом. Клетки паренхимы часто окрашены в коричневый или красно-коричневый цвет (дубильные вещества).

В препаратах соскоба сухого сырья должны быть видны крахмальные зерна, простые, округлые, овальные или грушевидные, без заметной слоистости и трещинок.

Измельченное сырье и порошок. При рассмотрении давленых микропрепаратов должны быть видны многочисленные фрагменты спиральных, кольчато-спиральных и лестничных сосудов; группы склеренхимных волокон с утолщенными пористыми стенками; фрагменты слоистой пробки, состоящей из крупных клеток с неравномерно утолщенными стенками; округлые или удлиненные клетки паренхимы, нередко с клейстеризованными крахмальными зернами или коричневым содержимым (дубильные вещества); в межклетниках групп паренхимных клеток могут встречаться очень узкие и короткие спиральные и кольчатые трахеиды.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

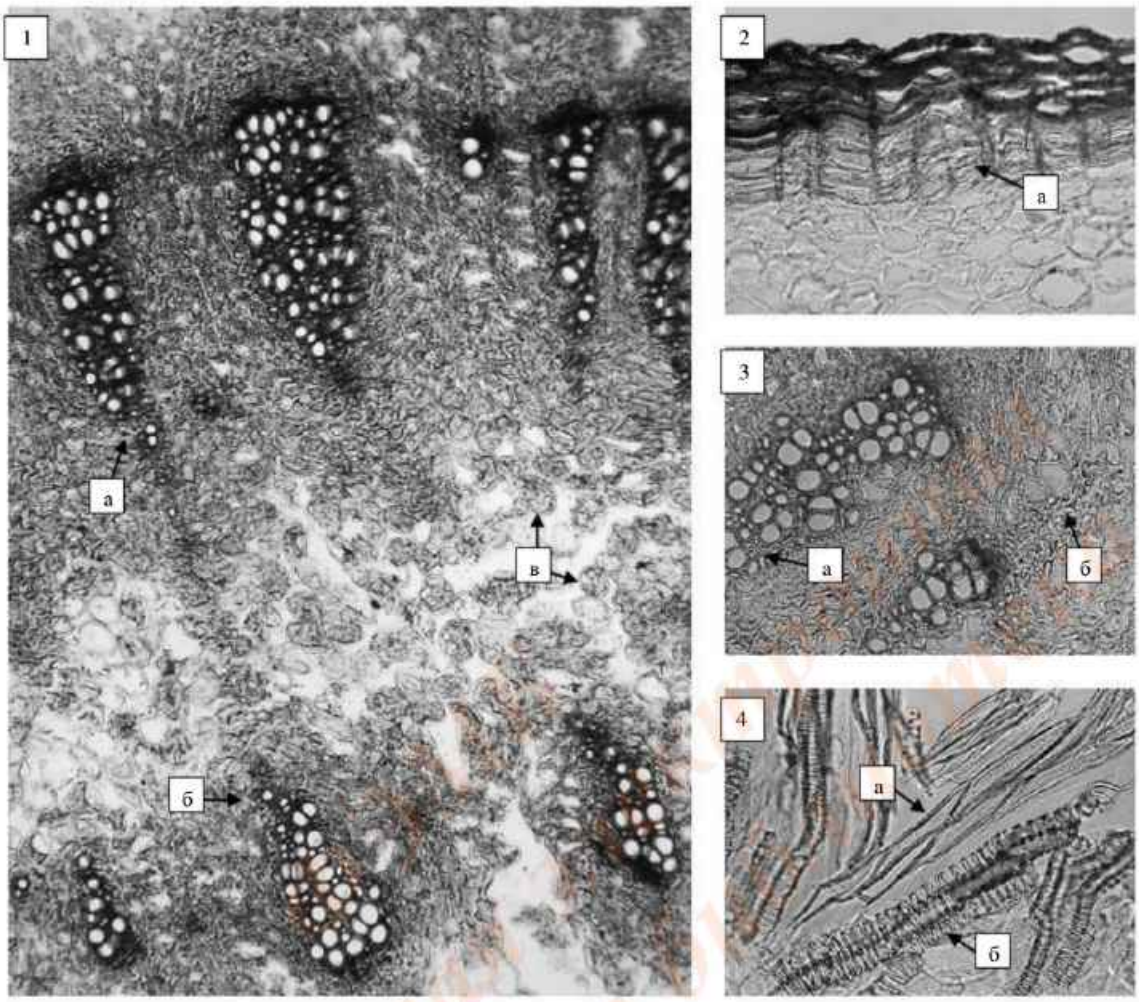


Рисунок 1 – Родиолы розовой корневища и корни.
1 – фрагмент поперечного среза корневища: а – сосудисто-волокнистые пучки первого кольца, б – сосудисто-волокнистые пучки второго кольца, в – клетки паренхимы (40×); 2 – фрагмент поперечного среза корневища: а – многослойная пробка (200×); 3 – фрагмент поперечного среза корневища, сосудисто-волокнистые пучки: а – сосуды ксилемы, б – флоэма (200×); 4 – давленый препарат: а – склеренхимные волокна с утолщенными пористыми стенками, б – фрагменты спиральных и лестничных сосудов (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

1. Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) розавина. Около 4,0 мг СО розавина растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в хорошо укупоренной упаковке в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор для детектирования. Смешивают последовательно: 0,5 мл анисового альдегида, 10 мл уксусной кислоты ледяной, 85 мл спирта 96 % и 5 мл серной кислоты концентрированной. Срок годности раствора не более 30 сут при хранении в хорошо укупоренной упаковке в прохладном, защищенном от света месте.

Около 1,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,25 мм, помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 70 - 80 мл спирта 70 %, закрывают пластмассовой пробкой и экстрагируют в течение 30 мин в ультразвуковой бане. Охлажденное до комнатной температуры извлечение вместе с частичками корневищ и корней, смывая их спиртом 70 %, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят спиртом 70 % до метки и тщательно перемешивают. Около 2 - 3 мл полученного раствора фильтруют через мембранный нейлоновый фильтр (размер пор 0,2 мкм), отбрасывая первые 1 - 2 мл фильтрата.

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором на алюминиевой подложке размером 10 × 10 см в виде полос длиной 10 мм, шириной не более 3 мм наносят по 40 мкл испытуемого раствора и раствора СО розавина.

Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре в течение 15 мин, помещают в камеру (предварительно выложенную изнутри фильтровальной бумагой и насыщенную не менее 1 ч) со смесью растворителей: хлороформ - спирт 96 % - вода (25:16:1) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, пластинку вынимают из камеры, сушат под тягой при комнатной температуре до удаления следов растворителей и просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм.

На хроматограмме раствора СО розавина должна обнаруживаться зона адсорбции фиолетового цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции фиолетового цвета (по розавину). Допускается обнаружение слабовыраженных зон выше и ниже указанной зоны.

Далее пластинку обрабатывают раствором для детектирования, нагревают в сушильном шкафу в течение 2 - 3 мин при 100 - 105 °С и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО розавина должна обнаруживаться коричневато-зеленая или зеленовато-серая зона.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться следующие зоны (снизу вверх от линии старта): сине- или серо-коричневая зона; коричневато-зеленая или зеленовато-серая зона (розавин); коричневая или красно-коричневая (салидрозид); допускается обнаружение дополнительных слабоокрашенных зон.

2. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Времена удерживания основных пиков на хроматограмме испытуемого раствора должны соответствовать временам удерживания основных пиков на хроматограммах раствора СО розавина и раствора СО салидрозида.

Испытание проводят методом ВЭЖХ одновременно с количественным определением.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье* – не более 13 %; *измельченное сырье, порошок* – не более 12 %.

Зола общая. *Цельное сырье* – не более 9 %; *измельченное сырье, порошок* – не более 8 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 4 %.

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 7 мм, – не более

5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 2 %. *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

Другие части растения (листья, стебли, в том числе отделенные при анализе). *Цельное сырье* – не более 4 %.

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

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 3 %.

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:* сумма гликозидов коричного спирта в пересчете на розавин - не менее 1 %, салидрозида - не менее 0,8 %.

Приготовление растворов.

Раствор СО розавина. Около 0,01 г (точная навеска) СО розавина растворяют в спирте 96 % в мерной колбе вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор А СО розавина).

Федеральный электронный медицинский библиотека ФЭМБ

10,0 мл раствора А СО розавина переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б СО розавина). Срок годности не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор СО салидрозида. Около 0,01 г (точная навеска) СО салидрозида растворяют в спирте 96 % в мерной колбе вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор А СО салидрозида).

10,0 мл раствора А СО салидрозида переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б СО салидрозида). Срок годности не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Приготовление фосфатного буфера (pH 7,0).

1. 8,0 г натрия гидроксида растворяют в воде (около 500 мл), полученный раствор доводят водой до метки в мерной колбе вместимостью 1000 мл (раствор натрия гидроксида 0,2 М).

Срок годности раствора 6 мес при хранении в хорошо укупоренной упаковке, в прохладном защищенном от света месте.

2. 6,8 г калия фосфата однозамещенного растворяют в 500 мл воды в мерной колбе вместимостью 2000 мл, затем добавляют 130 мл раствора натрия гидроксида 0,2 М, добавляют еще 800 мл воды и перемешивают. Значение pH определяют потенциометрически. При необходимости добавляют раствор натрия гидроксида 0,2 М и доводят объем раствора водой до метки.

Приготовленный раствор фильтруют под вакуумом через нейлоновый мембранный фильтр с размером пор не более 0,45 мкм.

Срок годности раствора сутки.

Проверка пригодности хроматографической системы.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

На хроматограмме раствора А испытуемого раствора (250 нм) в области пика, соответствующего по времени удерживания СО розавина, выходят не менее 3 пиков других гликозидов коричного спирта, из которых 1 слева и 2 справа от пика розавина.

На хроматограммах растворов СО число теоретических тарелок должно быть не менее 2000 для пика салидрозида и не менее 5000 для пика розавина.

На хроматограммах растворов СО фактор асимметрии (Т) для пиков салидрозида и розавина должен быть не менее 0,8 и не более 1,5.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,25 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом

вместимостью 100 мл, прибавляют 70 - 80 мл спирта 70 %, закрывают пластмассовой пробкой и экстрагируют в течение 30 мин в ультразвуковой бане. Охлажденное до комнатной температуры извлечение вместе с частичками корневищ и корней, смывая их спиртом 70 %, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят спиртом 70 % до метки и тщательно перемешивают. Около 3-5 мл полученного раствора фильтруют через мембранный нейлоновый фильтр (размер пор 0,2 мкм), отбрасывая первые 1 - 2 мл фильтрата (раствор А испытуемого раствора).

Хроматографические условия

Колонка	250 × 4,0 мм, эндкеппированный октадецилсилил (C_{18}) силикагель для хроматографии, 5 мкм
Предколонка	4 × 4 мм, эндкеппированный октадецилсилил (C_{18}) силикагель для хроматографии, 5 мкм
Подвижная фаза	А - ацетонитрил; В - фосфатный буфер (pH 7,0).
Способ элюирования	градиент

Время	**А, об. %**	**В, об. %**
0	11	89
10	11	89
30	30	70
35	60	40
45	60	40
50	11	89
70	11	89

Скорость потока мл/мин	1
Температура колонки, °С	+50 ± 1

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Детектор	спектрофотометрический или диодная матрица 219 нм (определение салидрозида) 250 нм (определение суммы гликозидов коричного спирта в пересчете на розавин)
Объем вводимой пробы, мкл	10
Время хроматографирования, мин	35

Хроматографируют последовательно не менее 3 раз растворы СО салидрозида (раствор А СО розавина) и СО розавина (раствор А СО салидрозида) и вычисляют среднее значение площади пика для каждого СО.

Испытуемый раствор хроматографируют не менее 3 раз.

Идентификацию пиков на хроматограмме раствора А испытуемого раствора проводят по времени удерживания в сравнении с хроматограммами внешних стандартов — растворов СО салидрозида и СО розавина.

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

$$X = \frac{S_1 \cdot a_0 \cdot 80 \cdot P}{S_0 \cdot a_1 \cdot (100 - W)},$$

где: S_1 – площадь пика салидрозида в растворе А испытуемогораствора;
a_0 – навеска СО салидрозида, г;
P – содержание салидрозида в СО, %;
S_0 – площади пика СО салидрозида;
a_1 – навеска сырья, г;
W – влажность сырья, %.

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

Гликозидам коричного спирта соответствуют четыре пика, выходящие вплотную друг за другом: пик розавина (имеет самую большую площадь), один пик слева от него и два пика справа от него.

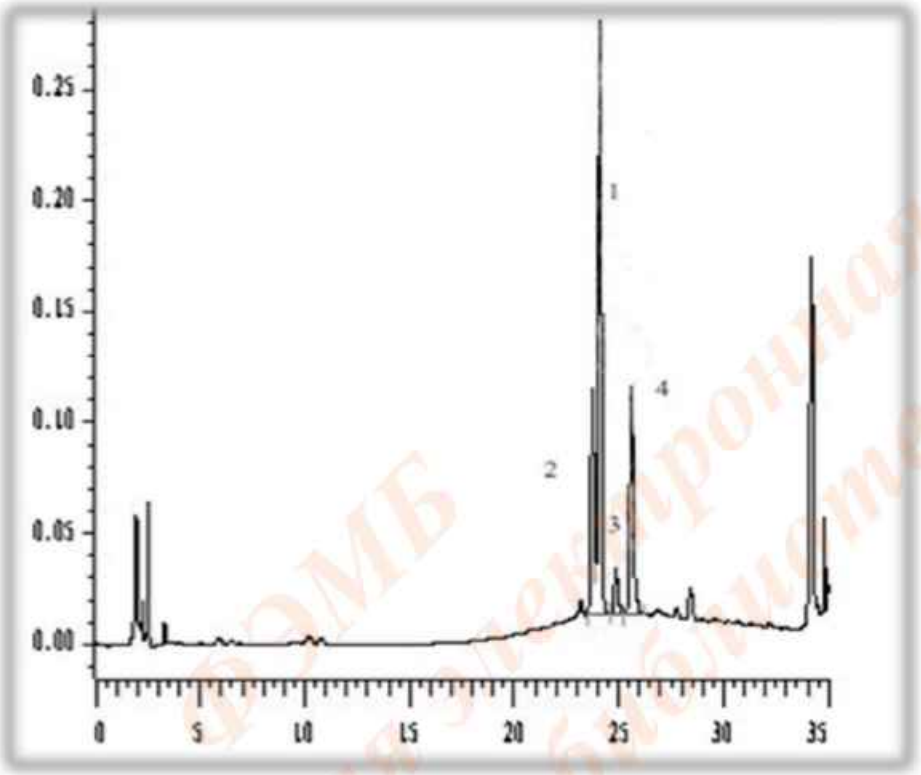


Рисунок 2 - Хроматограмма раствора А испытуемого раствора при длине волны 250 нм (пик № 1 соответствует розавину)

Содержание суммы гликозидов коричного спирта в пересчете на розавин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot a_0 \cdot 160 \cdot P}{S_0 \cdot a_1 \cdot (100 - W)},$$

где: S_1 – сумма площадей четырех пиков гликозидов коричного спирта в растворе А испытуемого раствора;

a_0 – навеска СО розавина, г;

P – содержание розавина в СО, %;

S_0 – площади пика СО розавина;

a_1 – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, г.

Федеральный электронный медицинский библиотека ФЭМБ

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».

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Ромашки аптечной цветки	**ФС.2.5.0037.15**
Chamomillae recutita flores	**Взамен ГФ XI, вып. 2, ст. 7**
	(изм. № 5 от 09.06.1999)

Собранные в начале цветения и высушенные цветки (цветочные корзинки) культивируемого и дикорастущего однолетнего травянистого растения ромашки аптечной (ромашки ободранной) – *Chamomilla recutita (*L.*) Rauschert (Matricaria recutita* L.*, M. chamomilla* L.*)*, сем. астровых – *Asteraceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Цельные или частично осыпавшиеся цветочные корзинки полушаровидной или конической формы, без ребристых цветоносов или с их остатками не длиннее 3 см. Корзинка состоит из краевых язычковых пестичных и срединных обоеполых трубчатых цветков. Цветоложе голое, мелкоямчатое, полое, в начале цветения полушаровидное, к концу – коническое. Обвертка корзинки черепитчатая, многорядная, состоящая из многочисленных продолговатых, с тупыми верхушками и широкими пленчатыми краями листочков. Размер корзинки (без язычковых цветков) 4 – 8 мм в поперечнике. Цвет язычковых цветков белый, трубчатых – желтый, обвертки – желтовато-зеленый, цветоносов – от светло-зеленого до зеленовато-коричневого. Запах сильный, ароматный. Вкус водного извлечения пряный, горьковатый, слегка слизистый.

Измельченное сырье. Кусочки цветочных корзинок и их частей, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×)

видны: кусочки цветочных корзинок конической, реже полушаровидной формы с черепитчатой многорядной обверткой, отдельные листочки обвертки желтовато- или серовато-зеленого цвета продолговато-яйцевидной формы с тупыми верхушками, широким пленчатым краем и темной полосой по середине (секреторный ход); кусочки голого, мелкоямчатого, полого цветоложа серовато-зеленого или коричневато-серого цвета; язычковые цветки цельные пестичные или их части с белым или желтовато-белым лопатчатым трехзубчатым отгибом; трубчатые цветки, обоеполые цельные, или их части с желтым пятизубчатым венчиком с длинной трубкой; кусочки зеленых, коричневато-зеленых, редко – коричневых линейных долей листьев, ребристых цветоносов и стеблей; мелкие серые или серовато-зеленые с беловатыми ребрышками незрелые семена.

Цвет измельченного сырья коричневато- или зеленовато-желтый с белыми, желтовато-белыми, желтыми, зелеными, зеленовато-коричневыми или коричневыми вкраплениями. Запах сильный ароматный. Вкус водного извлечения пряный, горьковатый, слегка слизистый.

Порошок. Смесь частиц цветков различной формы, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны цельные трубчатые обоеполые цветки с желтым пятизубчатым венчиком с длинной трубкой и их кусочки; кусочки ямчатого цветоложа, кусочки ребристых цветоносов, стеблей и линейных долей листьев от светло-зеленого до коричнево-зеленого цвета; фрагменты отгиба язычковых цветков белого или желтовато-белого цвета; листочки обвертки продолговато-яйцевидной формы, тупые с широким пленчатым краем желтоватого или желтовато-зеленого цвета и, как правило, темной полосой посередине (секреторный ход); незрелые семянки серые или зеленовато-серые с беловатыми ребрышками.

Цвет порошка коричневато-желтый с белыми, желтовато-белыми, зеленовато-серыми и коричневыми вкраплениями. Запах ароматный. Вкус

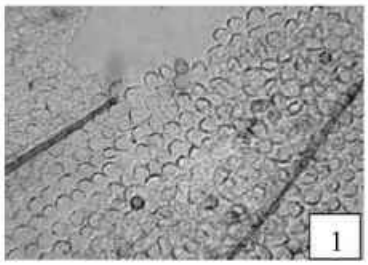
водного извлечения пряный, горьковатый, с ощущением слизистости.

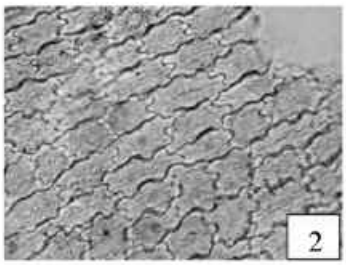
Микроскопические признаки. *Цельное, измельченное сырье.* При рассмотрении частей цветочной корзинки должны быть видны извилистостенные клетки эпидермиса отгиба венчика язычковых цветков с сосочковидными выростами, клетки эпидермиса трубки венчика язычковых цветков – прямостенные. Клетки эпидермиса отгиба венчика трубчатых цветков вытянутые, слегка извилистостенные, в зеве – клетки эпидермиса прямостенные. В мезофилле трубчатых цветков содержатся мелкие друзы кальция оксалата. На поверхности язычковых и особенно трубчатых цветков, а также на листочках обвертки имеются эфирномасличные железки, состоящие из 6 – 8 клеток, расположенных в 2 ряда и в 3 – 4 яруса. Эпидермис листочка обвертки извилистостенный с многочисленными устьицами, окруженными 3 – 4 околоустьичными клетками эпидермиса (устьичный аппарат аномоцитного типа). По жилке листочка обвертки эпидермальные клетки сильно вытянутые с утолщенными стенками, пронизанными многочисленными порами. Вдоль центральной жилки листочка обвертки и в цветоложе проходят секреторные ходы с маслянистым желтоватым содержимым. Пыльца – округлая шиповатая трехпоровая.

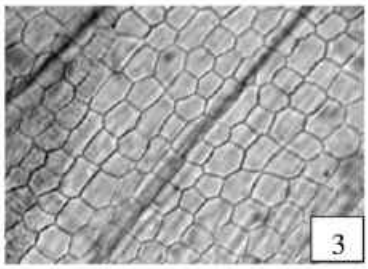
Порошок. При рассмотрении микропрепаратов порошка должны быть видны: фрагменты отгиба язычкового цветка и пятизубчатого венчика трубчатого цветка, клетки эпидермиса с нижней стороны которых – с тонкими извилистыми стенками, а с верхней – с сосочковидными выростами; пыльники трубчатых цветков, состоящие из удлиненных неравномерно-утолщенных клеток; пестики обоих типов цветков с двухлопастными рыльцами с многочисленными выростами; в мезофилле трубчатых и язычковых цветков, особенно завязи, содержатся мелкие друзы оксалата кальция; фрагменты листа и листочков обвертки, эпидермис которых со складчатой кутикулой состоит из клеток с извилистыми тонкими стенками, устьичный комплекс аномоцитного типа; у листочков обвертки под эпидермисом виден слой вытянутых клеток мезофилла с толстыми

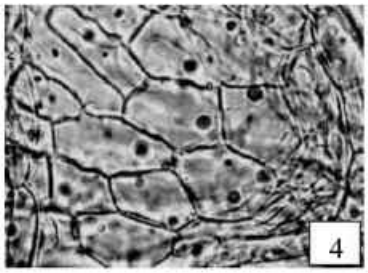
пористыми стенками, вдоль центральной жилки – секреторный ход с коричневато-желтым маслянистым содержимым; фрагменты эпидермиса листа и черешка с простыми многоклеточными волосками, состоящими из многоклеточного основания и саблевидной или клиновидной конечной клетки, часто обломанной; на поверхности язычковых и трубчатых цветков (особенно на завязи), на листочках обвертки, долях листа и черешке видны эфирномасличные железки, состоящие из 6 – 8 клеток, расположенных в 2 ряда и в 3 – 4 яруса, сверху они видны в виде овальных образований с поперечной перегородкой; фрагменты цветоложа, состоящие из крупных тонкостенных клеток с густой разветвленной сетью проводящих пучков, сопровождающихся широкими удлиненно-овальными секреторными вместилищами, заполненными коричневато-желтым маслянистым содержимым; фрагменты цветоложа с многочисленными ответвлениями проводящих пучков из 4 – 6 узких сосудов и трахеид, окруженные кольцом округло-многоугольных клеток с утолщенными одревесневшими оболочками (места прикрепления завязей трубчатых цветков); фрагменты покровной ткани незрелых семянок с эпидермисом из тонкостенных клеток и мезокарпием из удлиненных клеток с толстыми извилистыми стенками; многочисленные круглые пыльцевые зерна с шиповатой экзиной и тремя порами.

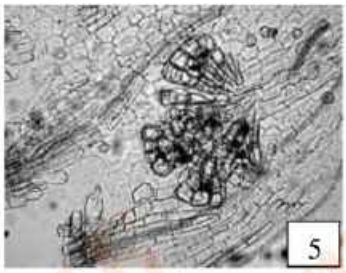
ФЭМБ Федеральный электронный медицинский библиотека

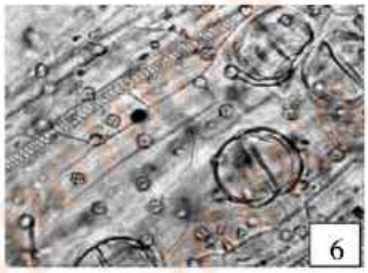


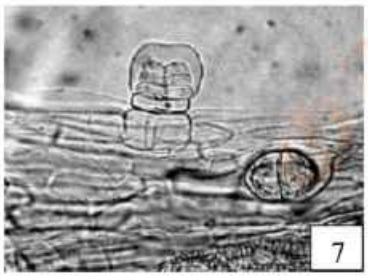


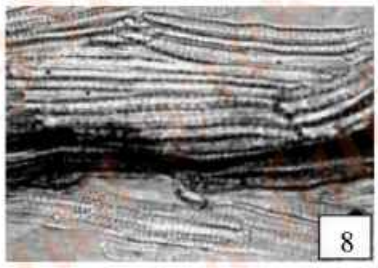


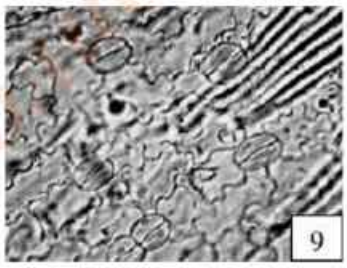












Федеральный ГБУ ДПО Медицинская академия

Рисунок – Ромашки аптечной цветки.
1 – фрагмент эпидермиса отгиба венчика язычкового цветка с сосочковидными выростами (200×), 2 – извилистостенные клетки эпидермиса отгиба венчика язычкового цветка (200×), 3 – прямостенные клетки эпидермиса трубки венчика язычкового цветка (300×), 4 – фрагмент эпидермиса отгиба венчика трубчатого цветка (300×), 5 – фрагмент эпидермиса в зеве венчика трубчатого цветка с пыльцой (200×), 6 – фрагмент эпидермиса трубчатого цветка с эфирномасличными железками (вид сверху) и друзами кальция оксалата (300×), 7 – фрагмент эпидермиса трубчатого цветка с эфирномасличными железками (вид сбоку и сверху) (300×), 8 – фрагмент эпидермиса по жилке листочка обвертки цветочной корзинки с секреторным ходом (300×), 9 – фрагмент эпидермиса листочка обвертки цветочной корзинки с устьицами аномоцитного типа (300×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) рутина. Около 0,001 г рутина (рутина тригидрата) растворяют в 10 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор СО кверцетина. Около 0,001 г кверцетина (кверцетинадигидрата) растворяют в 10 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Дифенилборилоксиэтиламина раствора 1 % в спирте 96 %. 1,0 г дифенилборилоксиэтиламина (дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира) растворяют в 100 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Полиэтиленгликоля (ПЭГ) раствора 5 % в спирте 96 %. 5 мл полиэтиленгликоля (ПЭГ) 400 смешивают со 100 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 6 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около 1,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл спирта 96 %, нагревают на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 10 мин.

После охлаждения до комнатной температуры полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля на полимерной подложке размером 10 × 10 см в виде полос длиной 1 см, шириной не более 3 мм наносят 20 мкл испытуемого раствора и, поверх друг друга (в одну полосу), по 10 мкл растворов СО рутина и СО кверцетина. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре в течение 5 мин, помещают в камеру, предварительно насыщенную не менее 30 мин и выложенной изнутри фильтровальной бумагой со смесью растворителей этилацетат - муравьиная кислота безводная - вода (40:4:6) 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.

Затем пластинку нагревают в сушильном шкафу в течение 2-3 мин при 100 - 105 ºС и еще теплую обрабатывают последовательно дифенилборилоксиэтиламина раствором 1 % в спирте 96 % и ПЭГ раствором 5 % в спирте 96 %, снова нагревают в сушильном шкафу в течение 1 мин при 100 - 105 ºС и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме растворов СО рутина и СО кверцетина должны обнаруживаться две флуоресцирующие зоны желтого или желто-оранжевого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться следующие флуоресцирующие зоны адсорбции: одна или две зоны оранжевого или желтого цвета; выше расположены несколько зон (друг за другом) зеленого, голубого или голубовато-зеленого цвета; на уровне СО рутина и СО кверцетина могут быть видны бледные желтые или голубовато-желтые зоны; допускается обнаружение дополнительных зон.

ИСПЫТАНИЯ

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

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 12 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 4 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 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 0,18 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

Листья, стебли, корзинки с остатками цветоносов длиннее 3 см. *Цельное сырье* – не более 9 %.

Корзинки, изменившие окраску (потемневшие и почерневшие). *Цельное сырье* – не более 5 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3 %.

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».

Федеральный ЭМГ Национальная электронная медицинская библиотека

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:* эфирного масла – не менее 0,3 %, суммы флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 1,2 %, экстрактивных веществ, извлекаемых водой, – не менее 18 %.

Определение ***эфирного масла*** проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1 или 2, навеска 15,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, время перегонки – 2 ч, окраска полученного эфирного масла должна быть от голубой до синей).

Сумма флавоноидов

Приготовление растворов.

Раствор СО рутина. Около 0,05 г (точная навеска) СО рутина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 85 мл спирта 70 % и нагревают на водяной бане до полного растворения. Затем охлаждают, доводят объем раствора до метки тем же спиртом и перемешивают (раствор А СО рутина). Срок годности раствора 30 сут при хранении в хорошо укупоренной упаковке, в прохладном защищенном от света месте.

1,0 мл раствора А СО рутина, 5 мл алюминия хлорида раствора 5 % в спирте 70 %, 2 капли уксусной кислоты разведенной, помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят спиртом 70 % до метки, перемешивают (раствор Б СО рутина).

Алюминия хлорида раствор 5 % в спирте 70 %. 5,0 г алюминия хлорида растворяют в 40 мл спирта 70 % в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают. Срок годности раствора 3 мес.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г (точная

навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл спирта 70 % и взвешивают с погрешностью ± 0,01 г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на кипящей водяной бане в течение 45 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры, взвешивают с погрешностью ± 0,01 г и при необходимости доводят содержимое колбы спиртом 70 % до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр, смоченный тем же спиртом, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А испытуемого раствора).

3,0 мл раствора А испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл алюминия хлорида раствора 5 % в спирте 70 % и через 10 мин – 2 капли уксусной кислоты разведенной, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивают (раствор Б испытуемый раствор).

Оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора измеряют через 30 мин на спектрофотометре при длине волны 415 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 3 мл раствора А испытуемого раствора, 2 капель уксусной кислоты разведенной, доведенный спиртом 70 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО рутина в таких же условиях. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл раствора А СО рутина, 2 капель уксусной кислоты разведенной, доведенный спиртом 70 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 25 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot 25 \cdot 100 \cdot (100 - W) \cdot 3 \cdot 100},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
A_0 – оптическая плотность раствора Б СО рутина;
a – навеска сырья, г;
a_0 – навеска СО рутина, г;
P – содержание основного вещества в СО рутина, %;
W – влажность сырья, г.

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

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1см}^{1\%} \cdot a \cdot 3 \cdot (100 - W)},$$

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

Экстрактивные вещества. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных препаратах» (метод 1, экстрагент – вода очищенная).

Примечание. Определение эфирного масла, суммы флавоноидов в пересчете на рутин проводят в сырье, предназначенном для производства лекарственных растительных препаратов (пачки, фильтр-пакеты); определение экстрактивных веществ, извлекаемых водой, проводят в сырье, предназначенном для производства лекарственных растительных препаратов (пачки, фильтр-пакеты); определение эфирного масла проводят в сырье, предназначенном для получения препаратов со значительным содержанием эфирного масла.

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».

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Сенны листья	**ФС.2.5.0038.15**
Sennae folia	**Взамен ГФ XI, вып. 2, ст. 23**
	(изм. № 1 от 24.01.1997)

Собранные в фазу цветения и плодоношения, высушенные и обмолоченные листья дикорастущих и культивируемых многолетних кустарников кассии остролистной (сенны) – *Cassia acutifolia Del.* (*C. senna* L.) и кассии узколистной – *Cassia angustifolia Vahl*., сем. бобовых – *Fabaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Отдельные листочки и черешки сложного парноперистого листа, цельные или частично измельченные; кусочки тонких травянистых стеблей; бутоны; цветки и незрелые плоды. Листочки удлиненно-ланцетовидные (*Cassia angustifolia*) или ланцетоовальные (*Cassia acutifolia*), заостренные к верхушке, наиболее широкие в средней части, у основания неравнобокие, тонкие, ломкие, цельнокрайние, с очень коротким черешком. Вторичные жилки, ясно заметные с обеих сторон, отходят под острым углом от главной жилки и соединяются между собой дугами, идущими параллельно краю листочка. Длина листочка 1 – 6 см (2 – 6 см у *Cassia angustifolia* и 1 – 3,5 см у *Cassia acutifolia*), ширина 0,4 – 2 см (0,6 – 2 см у *Cassia angustifolia* и 0,4 – 1,2 см у *Cassia acutifolia*). Плод боб, плоский, кожистый, слабоизогнутый, 3 – 5 см длиной, 1,5 – 2 см шириной. Цвет листочков от серовато-зеленого (*Cassia acutifolia*) или желтовато-зеленого (*Cassia angustifolia*) до коричневато-зеленого (*Cassia acutifolia, Cassia angustifolia*), матовый, иногда верхняя и

ФЭМБ Федеральный электронный медицинский библиотека

нижняя стороны листочков различаются по цвету; плодов – зеленовато-коричневый с темными очертаниями семенных камер; стеблей – серовато-зеленый, зеленовато-коричневый, желтовато- или серовато-белый; бутонов – коричневато-зеленый, желтовато-зеленый; цветков – желтый. Запах слабый. Вкус водного извлечения слегка горьковатый, с ощущением слизистости.

Измельченное сырье. Смесь кусочков листочков, черешков, стеблей, лепестков, чашелистиков, створок плодов и семян, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки листочков серовато-зеленого, желтовато-зеленого, реже – коричневато-зеленого цвета, с ясно заметными жилками и мелкими беловатыми прижатыми волосками с обеих сторон; кусочки черешков и стеблей серовато-зеленого, зеленовато-коричневого, желтовато- и серовато-белого цвета; кусочки створок плодов (бобов) зеленовато-коричневого, темно-коричневого и желтовато-белого цвета; кусочки семян с морщинисто-извилистой поверхностью, как правило, серовато- или желтовато-зеленого цвета; стекловидные кусочки эндосперма сероватого или желтоватого цвета; кусочки лепестков венчика желтого или светло-желтого цвета с коричневато-фиолетовыми прожилками и фрагменты чашечки.

Цвет измельченного сырья серовато-зеленый, светло-зеленый, желтовато-зеленый или коричневато-зеленый с желтыми, белыми и коричневыми вкраплениями. Запах слабый. Вкус водного извлечения слегка горьковатый, с ощущением слизистости.

Порошок. Смесь кусочков листочков, черешков, стеблей, лепестков, чашелистиков, створок плодов и семян, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

При рассмотрении порошка под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки листочков серовато-зеленого, желтовато-зеленого, реже – коричневато-зеленого цвета, с ясно заметными жилками и мелкими беловатыми прижатыми волосками с обеих сторон; кусочки черешков и

стеблей серовато-зеленого, зеленовато-коричневого, желтовато- и серовато-белого цвета; кусочки створок плодов (бобов) зеленовато-коричневого, темно-коричневого и желтовато-белого цвета; кусочки семян с морщинисто-извилистой поверхностью, как правило, серовато- или желтовато-зеленого цвета; стекловидные кусочки эндосперма сероватого или желтоватого цвета; кусочки лепестков венчика желтого или светло-желтого цвета с коричневато-фиолетовыми прожилками и фрагменты чашечки.

Цвет порошка серовато-зеленый, светло-зеленый или коричневато-зеленый с вкраплениями желтоватого, беловатого, коричневого и темно-коричневого цвета. Запах слабый. Вкус водного извлечения слегка горьковатый, с ощущением слизистости.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок.* При рассмотрении микропрепаратов должны быть видны: фрагменты листовой пластинки с эпидермисом из многоугольных прямостенных клеток; устьица окружены 2 (парацитный тип) или 3–5 (аномоцитный тип) клетками эпидермиса; волоски, простые одноклеточные толстостенные с бородавчатой поверхностью, как правило, серповидно-изогнутые, окружены розеткой клеток эпидермиса; в местах прикрепления опавших волосков в центре розетки видны округлые валики; вдоль жилок хорошо заметна кристаллоносная обкладка; в клетках мезофилла встречаются друзы оксалата кальция; лепестки или их фрагменты с эпидермисом из клеток с извилистым контуром, трудноразличимым из-за складчатой волнистой кутикулы; устьица аномоцитного типа; редко встречаются простые волоски; в мезофилле, особенно ближе к основанию лепестка, видны многочисленные друзы оксалата кальция; пыльники и их фрагменты с эпидермисом из извилистых клеток со складчатой кутикулой и клетками мезофилла с извилистыми пористыми утолщенными стенками; фрагменты эпидермиса створок плодов, состоящие из слегка вытянутых многоугольных прямостенных клеток с устьицами и простыми волосками, изредка встречаются пузыревидные волоски; фрагменты мезокарпия,

Федеральный электронный медицинский библиотека

состоящего из перекрестно-расположенных волнистых волокон с кристаллоносной обкладкой; фрагменты семенной кожуры с эпидермисом из столбчатых клеток и клеток с выростами в виде присосок; группы мелких клеток эндосперма с маслянисто-зернистым содержимым; фрагменты черешков и стеблей – сосуды, спиральные и сетчатые с простыми или окаймленными порами, склеренхимные волокна с кристаллоносной обкладкой, клетки паренхимы почти прямоугольной формы с друзами оксалата кальция.

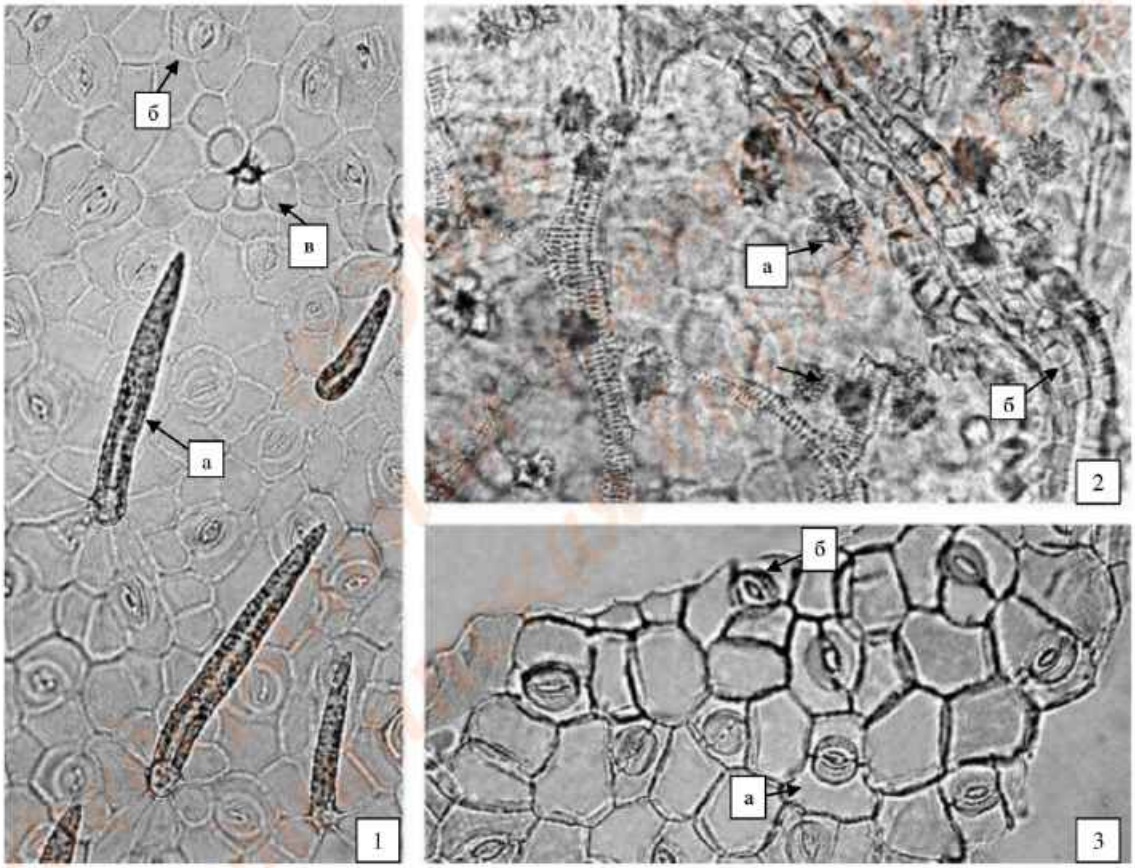


Рисунок – Сенны листья.
1 – фрагмент эпидермиса листа: а – простой бородавчатый волосок, б – устьица, с – округлый валик с розеткой клеток эпидермиса в месте прикрепления волоска (200×); 2 – фрагмент мезофилла листа: а – друза оксалата кальция, б – крупная жилка с кристаллоносной обкладкой (200×); 3 – фрагмент эпидермиса листа: а – устьица парацитного типа, б – устьица аномоцитного типа (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

1. ***Тонкослойная хроматография***

Приготовление растворов.

Раствор для детектирования 1. Азотной кислоты раствор 20 %.

Раствор для детектирования 2. Калия гидроксида раствор спиртовой 5 %.

Раствор стандартного образца (СО) сеннозида В. Около 0,001 г СО сеннозида В растворяют в 5 мл смеси равных объемов спирта 96 % и воды и перемешивают. Срок годности раствора 3 мес при хранении в хорошо укупоренной упаковке, в прохладном защищенном от света месте.

Раствор СО барбалоина. Около 0,002 г барбалоина (алоина) растворяют в 1 мл спирта 70 % и перемешивают. Срок годности раствора 7 сут при хранении в хорошо укупоренной упаковке, в прохладном защищенном от света месте.

Около 1,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 25 мл смеси равных объемов спирта 96 % и воды и нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 5 мин. После охлаждения полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля на алюминиевой подложке размером 10 × 10 см в виде полос длиной 10 мм, шириной не более 3 мм наносят 10 мкл испытуемого раствора и рядом 10 мкл раствора СО сеннозида В и 5 мкл раствора СО барбалоина. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре в течение 15 мин, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 60 мин смесью растворителей уксусная кислота ледяная – вода – этилацетат – пропанол (0,5:10:20:20), 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 1 и нагревают при 100 – 105 °С в течение 10 мин. После охлаждения пластинку обрабатывают раствором для детектирования 2 и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО сеннозида В должна обнаруживаться зона адсорбции коричнево-фиолетового или серо-фиоле-тового цвета; на хроматограмме раствора СО барбалоина должна обнаруживаться зона адсорбции фиолетово-коричневого или коричневого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться 3 зоны адсорбции коричнево-фиолетового или серо-фиолетового цвета, одна из которых расположена примерно на уровне зоны адсорбции СО сеннозида В, и 2 зоны адсорбции красно-коричневого или коричневого цвета, одна из которых расположена примерно на уровне зоны адсорбции СО барбалоина; допускается обнаружение других зон адсорбции.

2. 0,5 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещают в колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 10 мл натрия гидроксида раствора спиртового 10 % и нагревают с обратным холодильником на плитке в течение 2 мин. В горячем состоянии извлечение фильтруют через складчатый бумажный фильтр в пробирку вместимостью 30 мл и охлаждают до комнатной температуры. В пробирку прибавляют хлористоводородную кислоту разведенную 8,3 % до слабокислой реакции (по лакмусовой бумаге синей), затем прибавляют 10 мл эфира и перемешивают, при этом эфирный слой окрашивается в зеленовато-желтый цвет. 5 мл эфирного извлечения взбалтывают с равным объемом аммиака раствора 10 %; последний окрашивается в вишнево-красный цвет (оксиантрахиноны).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 12 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 12 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 4 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, – не более 3 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 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

Кусочки стеблей толще 2 мм. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3 %.

Листочки и плоды. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не менее 60 %.

Листочки, изменившие окраску (потемневшие и почерневшие). *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3 %.

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

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».

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок:* суммы агликонов антраценового ряда в пересчете на хризофановую кислоту – не менее 1,35 %.

Приготовление растворов.

Железа(III) хлорида раствор (плотность 1,07 – 1,08) (9 – 10%). 20,0 г железа(III) хлорида растворяют в 100 мл воды, доводят водой до плотности 1,07 – 1,08 и перемешивают. Срок годности раствора 3 мес при хранении в хорошо укупоренной упаковке, в прохладном защищенном от света месте.

Щелочно-аммиачный раствор. 50,0 г натрия гидроксида растворяют при перемешивании в 870 мл воды, после охлаждения прибавляют 80 мл аммиака раствора концентрированного 25 % и перемешивают. Срок годности раствора 1 сут.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 0,40 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл воды, перемешивают 10 мин и нагревают с обратным холодильником в кипящей водяной бане (уровень жидкости в колбе должен находиться на уровне поверхности воды) в течение 20 мин при периодическом перемешивании; после охлаждения под струей воды дают отстояться в течение 10 мин и фильтруют через бумажный складчатый фильтр.

25,0 мл фильтрата переносят в делительную воронку вместимостью 100 мл и дважды извлекают эфиром (порциями 40 и 20 мл). Фильтрат после экстракции помещают в колбу со шлифом вместимостью 200 – 250 мл. Объединенные эфирные извлечения дважды промывают водой по 10 мл. Воду отделяют и присоединяют к фильтрату в колбе со шлифом вместимостью 200 – 250 мл. Эфирные извлечения отбрасывают. Колбу с объединенными водными извлечениями нагревают на водяной бане до исчезновения запаха эфира, прибавляют 0,1 г натрия гидрокарбоната, 10 мл железа(III) хлорида раствора (плотность 1,07 – 1,08; 9 – 10 %) присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане при периодическом перемешивании в течение 20 мин; затем прибавляют 5 мл

серной кислоты раствора 50 % и продолжают нагревать еще 30 мин.

После охлаждения раствор переносят в делительную воронку вместимостью 300 мл, колбу ополаскивают 20 мл воды, затем 75 мл эфира; промывную воду и эфир присоединяют к основному раствору в делительной воронке и перемешивают в течение 5 мин. После разделения эфирный слой переносят в делительную воронку вместимостью 500 мл, оставляя темные хлопья в водном слое; из водного раствора дважды повторяют извлечение эфиром (порциями 30 и 20 мл). Объединенные эфирные извлечения фильтруют через стеклянный фильтр (ПОР 100), затем дважды промывают водой по 30 мл. К эфирному извлечению прибавляют 100 мл щелочно-аммиачного раствора и осторожно перемешивают в течение 5 мин. После отстаивания прозрачный водный слой сливают в мерную колбу вместимостью 250 мл, следя за тем, чтобы хлопья промежуточного слоя оставались в воронке. К эфирному извлечению прибавляют 20 мл воды и 3 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, воронку охлаждают под струей воды, смесь перемешивают в течение 2 мин и после разделения слоев водный слой сливают в ту же мерную колбу. Эфирное извлечение еще раз перемешивают с 50 мл щелочно-аммиачного раствора в течение 2 мин и после отстаивания водный слой сливают в ту же мерную колбу. Объединенные щелочно-аммиачные извлечения доводят щелочно-аммиачным раствором до метки и перемешивают (раствор А).

Через 15 мин измеряют оптическую плотность раствора А на спектрофотометре при длине волны 523 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения щелочно-аммиачный раствор.

Содержание суммы агликонов антраценового ряда в пересчете на хризофановую кислоту определяют одним из способов.

Расчет с использованием калибровочного графика. Концентрацию суммы агликонов антраценового ряда в растворе в пересчете на хризофановую кислоту определяют по калибровочному графику, построенному по растворам кобальта хлорида.

Построение калибровочного графика. Калибровочный график строят по растворам кобальта хлорида, исходя из того, что кобальта хлорида раствор 1 % по оптической плотности соответствует 4,3 мг хризофановой кислоты в 1 л щелочно-аммиачного раствора. Готовят кобальта хлорида растворы 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 и 4 %, которые имеют поглощение, соответствующее концентрациям хризофановой кислоты 4,3; 6,45; 8,6; 10,75; 12,9; 15,05 и 17,2 мг в 1 л. Измеряют оптическую плотность этих растворов на спектрофотометре при длине волны 523 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения воду. По оси ординат откладывают значения оптической плотности, а по оси абсцисс – концентрацию производных антрацена в миллиграммах на 1 л.

Содержание суммы агликонов антраценового ряда в пересчете на хризофановую кислоту в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{C \cdot 100 \cdot 250 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot 25 \cdot 1000 \cdot 1000 \cdot (100 - W)},$$

где C – концентрация суммы агликонов антраценового ряда, найденная по калибровочному графику, в мг на 1 л;
a – навеска сырья, г;
W – влажность сырья, %.

Допускается содержания суммы агликонов антраценового ряда в пересчете на хризофановую кислоту вычислять с использованием величины удельного показателя поглощения по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 250 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 25 \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора А;
$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения хризофановой кислоты при длине волны 523 нм, равный 432;
a – навеска сырья, г;
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».

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Синюхи голубой корневища с корнями **ФС.2.5.0039.15**

Polemonii caerulei rhizomata cum radicibus **Взамен ГФ XI, вып. 2, ст. 74**

Собранные весной или осенью, отмытые от земли, высушенные цельные и измельченные корневища с корнями дикорастущего и культивируемого многолетнего травянистого растения синюхи голубой *Polemonium caeruleum* L., сем. синюховых – *Polemoniaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Цельные или разрезанные вдоль корневища с корнями. Корневища горизонтальные, прямые или слегка изогнутые, иногда ветвящиеся, с многочисленными придаточными корнями; длина корневищ 0,5 – 5 см, толщина 0,3 – 2 см. Поверхность корневищ морщинистая, излом ровный или зернистый. В центре корневищ часто имеется полость вследствие разрушения сердцевины. Корни тонкие, длиной 7 – 35 см, толщиной 1 – 2 мм, мелкие, шероховатые, цилиндрические, узловатые, ломкие. Цвет корневищ с поверхности сероватый, на изломе желтовато-белый или белый. Корни снаружи желтовато-белые, на изломе – белые. Запах слабый, своеобразный. Вкус водного извлечения горьковатый.

Измельченное сырье. Кусочки корневищ и корней различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет светло-серый или желтовато-серый. Запах слабый, своеобразный. Вкус водного извлечения горьковатый.

Порошок. Под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видна смесь частиц серовато-белого или желтовато-белого цвета с коричневато-серыми

вкраплениями, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Запах слабый, своеобразный. Вкус водного извлечения горьковатый.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* На поперечном срезе корня видна покровная ткань, состоящая из 1 – 2 слоев округлых клеток эпидермиса с тонкими опробковевшими оболочками. Первичная кора состоит из крупных, тангентально вытянутых клеток с неравномерно утолщенными оболочками. Эндодерма хорошо выражена. Вторичная кора значительно уже первичной и состоит из мелких клеток – проводящих элементов луба и более крупных клеток лубяной паренхимы. Камбиальная зона слабо выражена. В древесине корня сосуды разного диаметра, располагаются без особого порядка, сердцевинные лучи незаметны. В паренхимных клетках коры и древесины содержатся капли жирного масла; изредка встречаются мелкие крахмальные зерна.

Покровная ткань представлена тонкой светлой двух-, трехслойной перидермой. Под пробковым слоем имеется слой гиподермы. Первичная кора тонкая, состоящая из однородных паренхимных клеток треугольной формы с крупными межклетниками, расположенными в 6 – 10 слоев. В клетках паренхимы встречаются зерна крахмала, капли жирного масла. Флоэма образована ситовидными трубками. Зона флоэмы узкая, на ее границе с первичной корой располагается эндодерма с выраженными поясками Каспари. Очертания ксилемы разнообразны: от очень широких участков до совсем узких. Границы между первичными и вторичными элементами ксилемы и флоэмы трудно различимы. На границе расположен секреторный слой. Камбиальная зона выражена состоит 3 – 5 слоев клеток. Проводящие пучки коллатеральные, открытые, расположены по кругу. Центр корневища занят округлой сердцевиной с однородными по форме и величинами клетками.

Измельченное сырье. При рассмотрении давленого микропрепарата под микроскопом видны крупные, тангентально вытянутые клетки первичной коры с неравномерно утолщенными оболочками с каплями жирного масла;

изредка встречаются мелкие крахмальные зерна, обрывки спиральных, реже сетчатых или лестничных сосудов. Клетки эндодермы крупные. Клетки эпидермиса имеют тонкие опробковевшие оболочки.

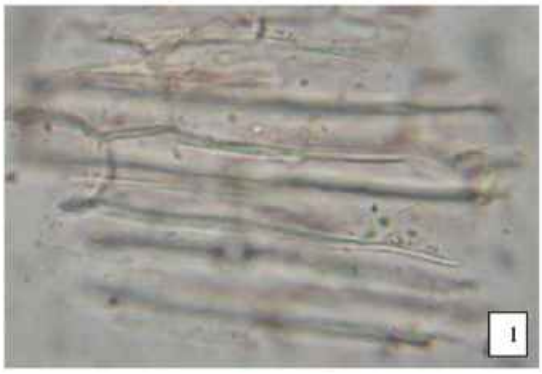
Порошок. Под микроскопом видны обрывки клеток эпидермиса с тонкими опробковевшими стенками, обрывки паренхимных клеток с крахмалом и каплями жирного масла, обрывки пористых и спиральных сосудов, обрывки эндодермы.



Рисунок 1 – Синюхи голубой корневища с корнями.
Поперечный срез корня в растворе флороглюцина (90×).



Рисунок 2 – Синюхи голубой корневища с корнями.
Поперечный срез корневища: а – перидерма, б – первичная кора,
в – эндодерма, г – флоэма, д – ксилема,
е – паренхима (90×).



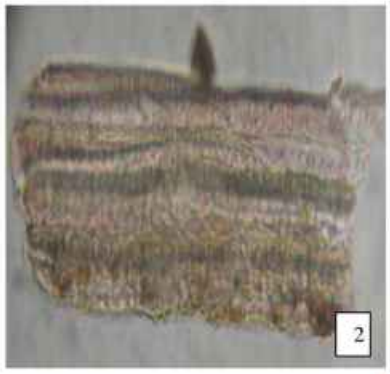


Рисунок 3 – Синюхи голубой корневища с корнями.
Препарат порошка (125×): 1 – части первичной коры, 2– обрывки проводящей системы (пористые и спиральные сосуды)

Определение основных групп биологически активных веществ

1. ***Тонкослойная хроматография***

Около 2,5 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, помещают в колбу со шлифом вместимостью 50 мл, прибавляют 20 мл спирта 70 % и нагревают на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 20 мин, затем охлаждают и фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля на алюминиевой подложке размером 10 × 10 см наносят 4 мкл испытуемого раствора. Пластинку с нанесенной пробой сушат на воздухе и помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин смесью растворителей бутанол – спирт 96 % – аммиак (7:2:5), 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 фосфорно-вольфрамовой кислоты спиртовым раствором 25 % и выдерживают в сушильном шкафу при температуре 105 °С в течение 5 мин.

На хроматограмме испытуемого раствора должно наблюдаться не менее 3 зон адсорбции коричневого цвета, не менее 3 зон адсорбции розово-фиолетового цвета; допускается обнаружение других зон адсорбции.

2. Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 2,0 г измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл воды и нагревают на плитке при частом перемешивании в течение 10 мин, затем охлаждают и фильтруют через бумажный фильтр. 5 мл фильтрата помещают в пробирку и сильно встряхивают, образуется обильная и стойкая пена (сапонины).

ИСПЫТАНИЯ

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

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 13 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 7 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье:* 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 1 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Корневища, потемневшие на изломе. *Цельное сырье* – не более 3 %.

Кусочки корневищ, потемневшие на изломе. *Измельченное сырье* – не более 3 %.

Корневища с остатками стеблей длиной свыше 10 мм. *Цельное сырье* – не более 5 %.

Кусочки корней размером свыше 20 мм. *Измельченное сырье* – не более 5 %.

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

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 2 %.

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:* суммы тритерпеновых сапонинов в пересчете на β-эсцин – не менее 10 %; экстрактивных веществ, извлекаемых водой, – не менее 20 %.

Сумма тритерпеновых сапонинов

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) β-эсцина. Около 0,05 г (точная навеска) СО β-эсцина, высушенного до постоянной массы, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 50 – 70 мл уксусной кислоты ледяной при перемешивании, доводят тем же растворителем до метки и снова перемешивают (раствор А СО β-эсцина).

5,0 мл раствора А СО β-эсцина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора уксусной кислотой ледяной до

метки и снова перемешивают (раствор Б СО β-эсцина). Срок годности раствора не более 30 сут.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 0,5 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в патрон из фильтровальной бумаги, экстрагируют хлороформом в аппарате Сокслета в течение 2 ч. Хлороформное извлечение отбрасывают, патрон с сырьем сушат до полного испарения хлороформа. Затем патрон с сырьем помещают в колбу вместимостью 250 мл, приливают 50 мл спирта 70 %, колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане в течение 1,5 ч. Полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр в круглодонную колбу для отгонки, патрон с сырьем дважды промывают спиртом 70 % порциями по 5 мл и фильтруют через тот же фильтр в ту же колбу. Полученное объединенное извлечение отгоняют с помощью роторного испарителя при пониженном давлении досуха. Сухой остаток в колбе растворяют в уксусной кислоте ледяной, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем тем же растворителем до метки и перемешивают (раствор А испытуемого раствора).

1,0 мл раствора А испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора уксусной кислотой ледяной до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора).

В колбу со шлифом помещают 2,0 мл раствора Б испытуемого раствора, прибавляют 2 мл уксусной кислоты ледяной и 2 мл серной кислоты концентрированной и кипятят с обратным холодильником в течение 1 ч, затем охлаждают и измеряют оптическую плотность полученного раствора В испытуемого раствора при длине волны 282 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 4 мл уксусной кислоты ледяной и 2 мл серной кислоты концентрированной, выдержанный в тех же условиях.

Параллельно в тех же условиях измеряют оптическую плотность

раствора В СО β-эсцина, приготовленного в тех же условиях.

Содержание суммы тритерпеновых сапонинов в пересчете на β-эсцин в абсолютно сухом сырье в процентах *(X)* вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 5 \cdot 2 \cdot 25 \cdot 25 \cdot P \cdot 100}{A_0 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 2 \cdot a \cdot 1 \cdot 100 \cdot (100 - W)} \cdot 100,$$

где A – оптическая плотность раствора В испытуемого раствора;
A_o – оптическая плотность раствора В СО β-эсцина;
a_o – навеска СО β-эсцина, г;
a – навеска сырья, г;
P – содержание основного вещества в СО β-эсцина, %;
W – влажность сырья, %.

Экстрактивные вещества. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержание экстрактивных веществ в лекарственном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1, экстрагент - вода).

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».

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Солодки корни	**ФС.2.5.0040.15**
Glycyrrhizae radices	**Взамен ГФ X, ст. 573**
	(изм. № 1 от 17.02.1999)

Собранные в разное время года неочищенные (naturales) или очищенные (mundatae) от пробки корни и подземные побеги многолетних дикорастущих травянистых растений солодки голой – *Glycyrrhiza glabra* L. и солодки уральской – *Glycyrrhiza uralensis Fisch*., сем. бобовых – *Fabaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Куски корней и подземных побегов цилиндрической формы различной длины и толщины. Встречаются куски корней, переходящие в сильно разросшееся корневище более 10 см толщиной.

Поверхность неочищенных корней и побегов продольно-морщинистая, покрытая серовато-коричневой или коричневой пробкой; очищенное сырье снаружи от светло-желтого до коричневато-желтого цвета с незначительными остатками пробки; излом от светло-желтого до желтовато-оранжевого цвета, зернисто-волокнистый.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) на поперечном срезе корней и подземных побегов видны многочисленные широкие сердцевинные лучи и вытянутые группы сосудов, придающие хорошо заметное лучистое строение. Вдоль сердцевинных лучей часто образуются радиальные трещины. У побегов имеется небольшая сердцевина, у корней сердцевины нет. Запах слабый. Вкус водного извлечения сладкий,

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

приторный, слегка раздражающий.

Измельченное сырье. Кусочки сырья различной формы, как правило, волокнистые, размером от 1 до 10 мм (для неочищенного сырья) и от 1 до 6 мм (для очищенного сырья) или проходящие сквозь сито с отверстиями размером 6 мм (для лекарственных растительных препаратов).

Цвет очищенного сырья от светло-желтого до коричневато-желтого с незначительными остатками пробки; неочищенного сырья – желтый, серовато-желтый, коричневато-желтый, с остатками пробки серовато-коричневого или коричневого цвета. Запах слабый, Вкус водного извлечения сладкий, приторный, слегка раздражающий.

Порошок. Кусочки сырья различной формы, как правило, волокнистые, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

Цвет очищенного сырья от светло-желтого до коричневато-желтого с незначительными остатками пробки; неочищенного сырья – желтый, серовато-желтый, коричневато-желтый, с остатками пробки серовато-коричневого или коричневого цвета. Запах слабый. Вкус водного извлечения сладкий, приторный, слегка раздражающий.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении микропрепаратов поперечного среза у неочищенного корня должна быть видна многослойная пробка, под пробкой – первичная кора, состоящая из крупных вытянутых клеток, нередко с призматическими кристаллами оксалата кальция (у очищенных корней вместе с пробкой частично удалена и первичная кора). Первичная кора переходит в хорошо развитую широкую вторичную кору, в которой видны широкие, к поверхности, иногда расширяющиеся сердцевинные лучи, чередующиеся с лубом, состоящим из ситовидных трубок, лубяных волокон и паренхимных клеток. Ситовидные трубки, кроме узкого слоя, прилегающего к камбию, сдавлены и представляют собой деформированный (облитерированный) луб, образующий удлиненный конус, обращенный широким основанием к

камбию, а вытянутая вершина проходит, изгибаясь между группами лубяных волокон. Лубяные волокна с сильно утолщенными стенками и узкой полостью собраны группами и окружены кристаллоносной обкладкой. Паренхимные клетки коры и сердцевинных лучей содержат зерна крахмала – простые, округлые или яйцевидные. Древесина состоит из сосудов разного диаметра – от узкого до очень широкого, групп склеренхимных волокон с кристаллоносной обкладкой и паренхимы, содержащей крахмал. При окраске раствором йода сердцевинные лучи и паренхима окрашиваются в синий цвет, деформированный луб не окрашивается и остается сероватым, сосуды становятся желтыми, группы волокон коры и древесины оранжевыми. На продольно-радиальном срезе в коре и древесине видны длинные, сильно утолщенные склеренхимные волокна с кристаллоносной обкладкой; в древесине узкие сосуды – сетчатые, средние – со щелевидными порами и широкие – с бочковидными короткими члениками и щелевидными окаймленными порами, расположенными косыми рядами.

Измельченное сырье и порошок. При рассмотрении микропрепаратов должны быть видны фрагменты тонкостенной паренхимы, состоящие из округлых или округло-многоугольных клеток, часто с группами призматических кристаллов оксалата кальция; группы волокон коры и древесины, обычно с кристаллоносной обкладкой; фрагменты луба с ситовидными трубками; фрагменты или группы сетчатых сосудов различного диаметра со щелевидными окаймленными порами, нередко в сопровождении пучков волокон (членики широких сосудов, как правило, короткие, бочковидные); фрагменты пробки, состоящие из нескольких слоев многоугольных клеток.

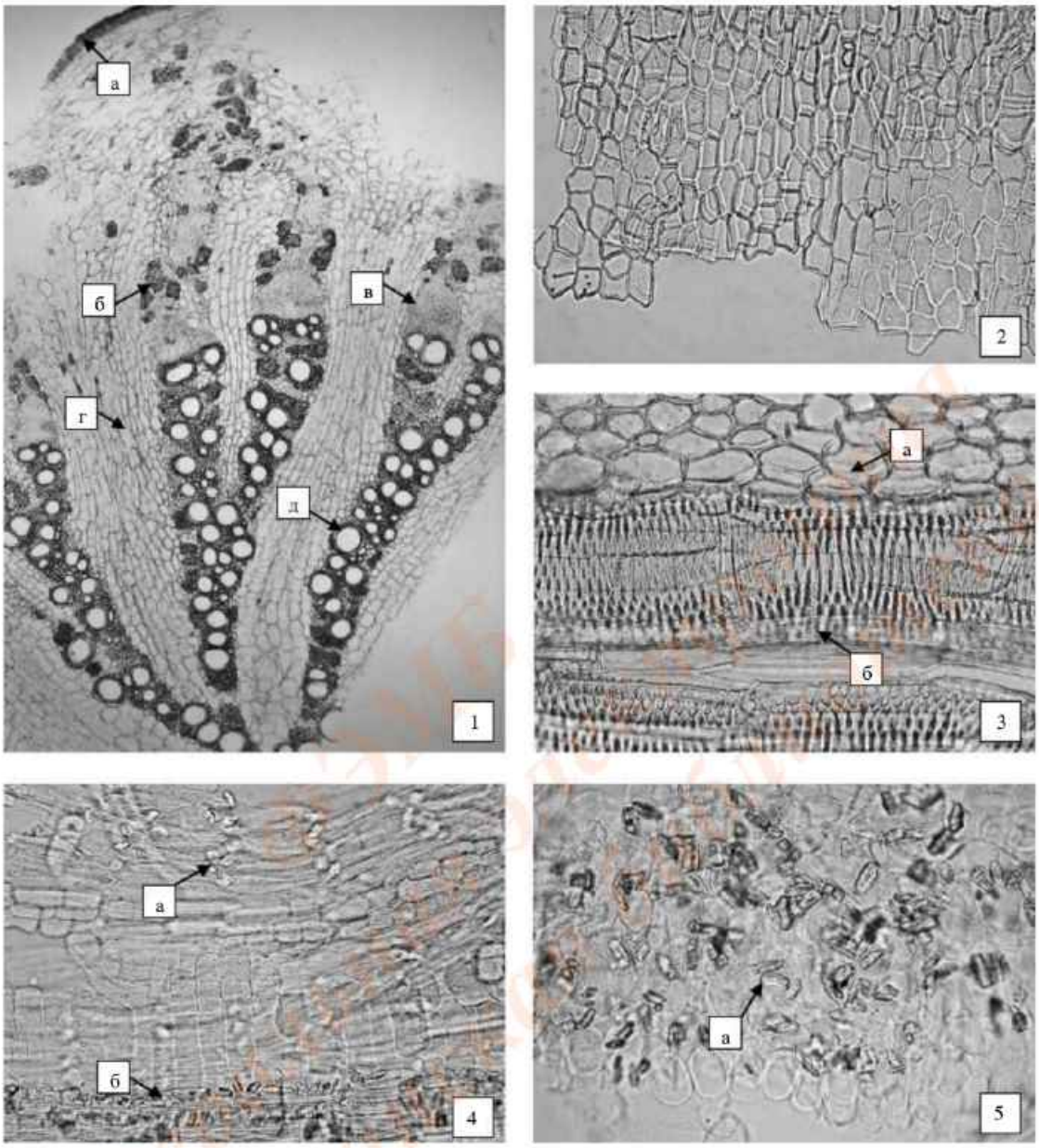


Рисунок – Солодки корни.

1 – фрагмент поперечного среза неочищенного корня: а – пробка, б – лубяные волокна, в – облитерированный луб, г – сосуды ксилемы, д – паренхима сердцевинных лучей (40×); 2 – фрагмент многослойной пробки (200×); 3 – фрагмент продольного среза: а – клетки паренхимы, б – сетчатые сосуды с окаймленными щелевидными порами (400×); 4 – фрагмент корня: а – ситовидные трубки луба, б – волокна с кристаллоносной обкладкой (200×); 5 – фрагмент корня: а – паренхимные клетки коры с призматическими кристаллами оксалата кальция (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) 18β-глицирризиновой кислоты. Около 0,005 г СО моноаммониевой соли глицирризиновой кислоты растворяют в 1 мл смеси спирт 96 % – вода (1:1 о/о). Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор СО кверцетина. Около 0,001 г СО кверцетина растворяют в 10 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около 0,5 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, приливают 10 мл смеси спирт 96 % – вода (1:1) и кипятят с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 10 мин. После охлаждения до комнатной температуры извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором на алюминиевой или полимерной подложке размером 10 × 10 см в виде полос длиной 10 мм, шириной не более 3 мм наносят 5 мкл испытуемого раствора и, поверх друг друга (в одну полосу) и по 5 мкл растворов СО 18β-глицирризиновой кислоты и СО кверцетина. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре, помещают в камеру (без предварительного насыщения) со смесью растворителей *н*-бутанол – уксусная кислота ледяная – вода (7:1:2) 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 просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм.

На хроматограмме раствора СО 18β-глицирризиновой кислоты и раствора СО кверцетина должны обнаруживаться 2 темные зоны адсорбции.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться 2 основные темные зоны адсорбции на уровне зон на хроматограммах раствора

СО 18β-глицирризиновой кислоты и раствора СО кверцетина, 1 или 2 менее выраженные зоны адсорбции в промежутке между ними; допускается обнаружение других зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье: неочищенное* – не более 14 %; *очищенное* – не более 14 %. *Порошок* – не более 14 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье: неочищенное* – не более 8 %; *очищенное* – не более 8 %. *Порошок* – не более 8 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье: неочищенное* – не более 2,5 %; *очищенное* – не более 1 %. *Измельченное сырье: неочищенное* – не более 2,5 %; *очищенное* – не более 2,5 %. *Порошок* – не более 2,5 %.

Измельченность сырья. *Измельченное сырье (неочищенное и очищенное):* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 10 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, не более 5 %; частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 6 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 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

Корни, дряблые в изломе, желто-коричневые, и остатки стеблей. *Цельное сырье: неочищенное* – не более 4 %.

Корни, плохо очищенные от пробки. *Цельное сырье: очищенное* – не более 15 %.

Примечание. Плохо очищенными считаются корни с остатками более 3 участков темно-коричневой пробки на одном куске или при поперечнике остатков пробки более 10 мм.

Федеральный ЭМБ Электронная медицинская библиотека

Корни, потемневшие и темно-коричневые на поверхности, но светло-желтые в изломе. *Цельное сырье: очищенное* – не более 20 %.

Частицы корней, потемневшие на поверхности. *Измельченное сырье: очищенное* – не более 15 %.

Частицы, плохо очищенные от пробки. *Измельченное сырье: очищенное* – не более 3 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье: неочищенное* – не более 1 %; *очищенное* – не более 0,5 %. *Измельченное сырье: неочищенное* – не более 1 %; *очищенное* – не более 0,5 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье: неочищенное* – не более 1 %; *очищенное* – не более 0,5 %. *Измельченное сырье: неочищенное* – не более 1 %; *очищенное* – не более 0,5 %. *Порошок* – не более 1 %.

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 (неочищенное и очищенное), измельченное сырье (неочищенное и очищенное), порошок:* содержание глицирризиновой кислоты – не менее 6 %

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,2 мм. Около 2,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу вместимостью

150 мл, прибавляют 20 мл ацетонового раствора азотной кислоты 3 % и смесь оставляют на 1 ч при частом и сильном перемешивании. Извлечение фильтруют в цилиндр вместимостью 100 мл и промывают 10 мл ацетона и фильтруют через тот же фильтр. В колбу с сырьем прибавляют еще 20 мл ацетона, которым одновременно смывают сырье с фильтра, и смесь кипятят с обратным холодильником на водяной бане в течение 5 мин. Извлечение фильтруют через тот же фильтр в тот же цилиндр. Экстракцию горячим ацетоном повторяют, таким образом, еще 2 раза, промывают ацетоном до тех пор, пока объем в цилиндре не достигнет 100 мл. Извлечение из цилиндра выливают в стакан вместимостью 200 мл. Цилиндр ополаскивают 40 мл спирта, который затем выливают в тот же стакан. Далее по каплям при интенсивном помешивании добавляют аммиака концентрированный раствор до появления обильного светло желтого творожистого осадка (pH 8,3 - 8,6 устанавливают потенциометрически или по порозовению влажной фенолфталеиновой бумаги). Осадок вместе с маточной жидкостью переносят на фильтр, помещенный в воронку Бюхнера, и жидкость отсасывают. Стакан и фильтр с осадком промывают 50 мл ацетона в 3 - 4 приема. Осадок с фильтром переносят в стакан, в котором производилось осаждение, и растворяют в 50 мл воды. Полученный раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 250 мл. Фильтр несколько раз промывают небольшими порциями воды и присоединяют их к основному раствору. Доводят объем раствора до метки (раствор А).

3,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора водой до метки (раствор Б).

Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре при длине волны 258 нм в кювете с толщиной слоя в 10 мм, в качестве раствора сравнения используют воду.

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

$$X = \frac{A \cdot 822 \cdot 250 \cdot 50 \cdot 100}{a \cdot 3 \cdot 11000 \cdot 1000}$$

где: A – оптическая плотность раствора Б;
a – навеска сырья, г;
822 – молекулярный вес глицирризиновой кислоты;
11000 – молярный показатель поглощения.

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».

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

Сосны обыкновенной почки	**ФС.2.5.0041.15**
Pini silvestris gemmae	**Взамен ГФ XI, вып. 2, ст. 42**

Собранные в конце зимы или ранней весной до начала распускания высушенные почки многолетнего вечнозеленого дерева сосны обыкновенной – *Pinus silvestris* L., сем. сосновых – *Pinaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Почки (укороченные верхушечные побеги) одиночные или по нескольку штук в мутовках, окружающих более крупную центральную почку, без стебля или с остатком стебля, длиной не более 3 мм. Почки яйцевидной, яйцевидно-конической или удлиненно-яйцевидной формы, острые, плотно-сомкнутые. Поверхность почек покрыта сухими, спирально расположенными ланцетовидными или треугольными, заостренными по краям бахромчатыми чешуйками, склеенными между собой выступающей смолой. Под чешуями находятся недоразвитые парные зеленые хвоинки – иглы. Интенсивность окраски чешуй уменьшается от наружных к внутренним, а в каждой чешуе – от середины к краям, бахромка по краю бесцветная. На поперечном срезе почки имеют округлую форму.

Цвет почек снаружи розовато-коричневый, красновато-коричневый, на изломе зеленый или коричневый. Длина почек 1 – 4 см. Запах ароматный, смолистый. Вкус водного извлечения горьковатый.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении внутреннего эпидермиса наружной чешуи с поверхности должны быть видны прямоугольные тонкостенные, широкополостные эпидермальные клетки, с наружной стороны чешуи с сильно утолщенными стенками и узкой

полостью, боковые стенки этих клеток пронизаны поровыми канальцами. Краевые клетки наружного эпидермиса в средней части чешуи тонкостенные, с обильными щелевидными порами, бахромка состоит из длинных тонкостенных клеток, напоминающих волоски, которые в месте отхождения от чешуи коленообразно изогнуты. Внешняя стенка эпидермальных клеток очень плотная, полость незначительная и имеет бутылковидную форму. Строение внутренней чешуи сходно со строением наружной чешуи, но при рассматривании с поверхности видно, что у внутренних чешуй боковые стенки клеток пронизаны более частыми поровыми канальцами. В более толстых чешуях находятся смоляные ходы, которые идут от основания чешуйки до ее верхушки.

В поперечном разрезе чешуи должны быть видны вертикально вытянутые клетки наружного эпидермиса, желтоватого цвета, составляющие до 1/3 толщины чешуи в наиболее широкой, средней ее части. Клетки внутреннего эпидермиса в поперечном сечении овальные или прямоугольные, низкие. Мезофилл чешуи спавшийся, в наиболее широкой ее части имеется до 4 рядов клеток, число рядов уменьшается к краям чешуи. Под верхним эпидермисом могут присутствовать клетки с утолщенными стенками.

В поперечном разрезе почки в паренхиме продольно в виде кольца располагаются очень крупные смоляные ходы, выстланные эпителиальными клетками.

Федеральная электронная медицинская библиотека

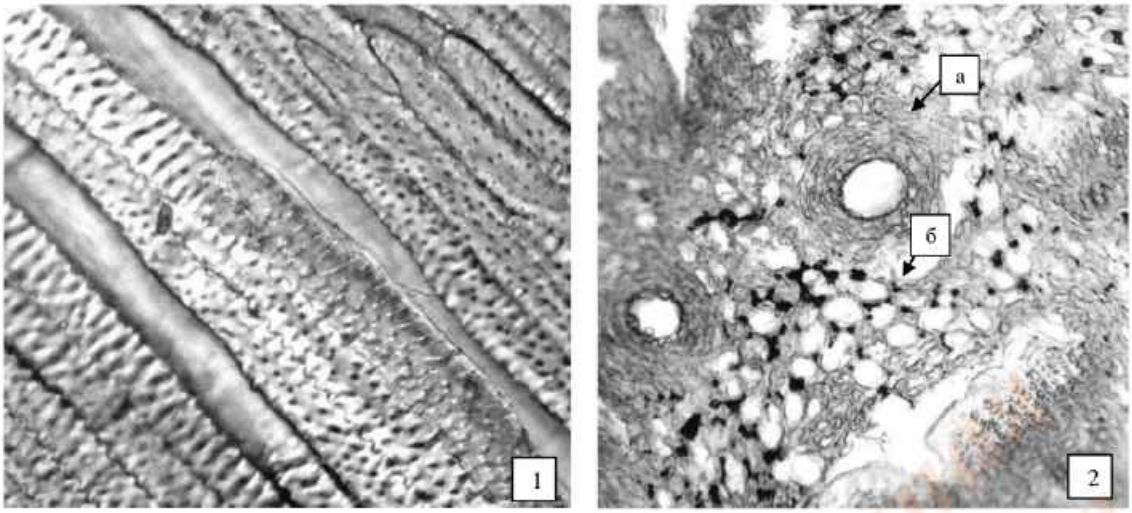


Рисунок – Сосны обыкновенной почки.
1 – эпидермис наружной стороны чешуи (240×); 2 – фрагмент поперечного среза: а – смоляной ход, б – клетки паренхимы (240×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Около 0,1 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещают в плоскодонную коническую колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл толуола и перемешивают на механическом шейкере в течение 15 мин. Затем содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля на алюминиевой подложке размером 10 × 10 см наносят 50 мкл испытуемого раствора. Пластинку с нанесенной пробой сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин смесью растворителей толуол – этилацетат (42,5:2,5), 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 просматривают в УФ-свете при 254 нм.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией фиолетового цвета; допускается обнаружение других зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье* – не более 13 %.

Зола общая. *Цельное сырье* – не более 2 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье* – не более 1 %.

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

Посторонние примеси

Почки, почерневшие внутри. *Цельное сырье* – не более 10 %.

Почки со стеблем длиной более 3 мм и переросшие. *Цельное сырье* – не более 10 %.

Хвоя. *Цельное сырье* – не более 0,5 %.

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

Минеральная примесь. *Цельное сырье* – 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:* эфирного масла – не менее 0,3 %.

Определение эфирного масла проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 2, из навески 20,0 г крупноизмельченного (без просеивания) сырья, время перегонки - 2 ч).

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».

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Тополя почки	**ФС.2.5.0042.15**
Populi Gemmae	**Вводится впервые**

Собранные с конца осени, зимой или ранней весной до начала распускания и высушенные боковые (пазушные) и верхушечные (терминальные) почки тополя черного – *Populus nigra* L., тополя бальзамического – *Populus balsamifera* L., тополя канадского – *Populus canadensis Marsh*., тополя лавролистного – *Populus laurifolia* Ledeb. и тополя душистого – *Populus suaveolens Fisch*., сем. ивовых – *Salicaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) почки вытянутые, конические, заостренные с округлым основанием, на ощупь клейкие. Верхушечные (терминальные) почки имеют яйцевидно-удлиненную форму и заостренную верхушку. Боковые (пазушные) почки имеют коническую форму с округлым основанием. Длина почек от 7 до 25 мм, в поперечнике – от 2 до 9 мм. С поверхности – почки гладкие, блестящие, у краев чешуй – смолистые. Чешуи располагаются по спирали, нижние коричневого цвета – мелкие, округлые, жесткие; верхние – более светлые с зеленоватым оттенком, крупные овальные, конически заостренные. Верхушечные почки имеют 9 – 12 кроющих чешуй, боковые – 5 – 7. Края чешуй прилегают плотно, кончики (верхушки) нижних и средних чешуй слегка отогнуты.

Запах сладковатый, смолистый, усиливающийся при разламывании почки. Вкус водного извлечения характерный, жгуче-горький.

Микроскопические признаки. При рассмотрении чешуи почки с поверхности должно быть видно, что клетки эпидермиса наружной стороны слегка вытянутые, с неравномерно утолщенными клеточными стенками и простыми порами, а клетки эпидермиса внутренней стороны – с тонкими прямыми стенками. На верхушке и по краям чешуи на клетках наружного эпидермиса встречаются простые одноклеточные толстостенные кутинизированные, часто обломанные волоски с гладкой поверхностью.

На поперечном срезе чешуи должен быть виден однослойный наружный эпидермис со слегка вытянутыми относительно продольной оси чешуи округлыми или шлемовидными клетками, стенки которых покрыты толстым слоем кутикулы и имеют четковидные утолщения. Внутренний эпидермис чешуи также однослойный, состоит из столбчатых клеток с тонкими стенками, некоторые клетки заполнены желтоватого цвета содержимым. Клетки внутреннего эпидермиса по краю чешуи – одревесневшие.

Под наружным и внутренним эпидермисом располагается пробка, представленная радиальными рядами клеток филлемы. Наиболее развита пробка в нижних чешуях, а также в верхушках верхних чешуй и центральной наружной части средних и верхних чешуй. У верхних чешуй встречается крайне слабо развитая (1 – 2 ряда клеток) наружная пробка, а внутренняя – часто отсутствует.

Основная ткань чешуи – рыхлая паренхима, состоящая из клеток с коричневым содержимым. В верхушках чешуи клетки паренхимы одревесневшие. В основной паренхиме чешуи встречаются группы склереид и друзы оксалата кальция.

Проводящие пучки – неполные и представлены в нижней и средней части чешуи трахеидами; в верхушках чешуи проводящие пучки отсутствуют.

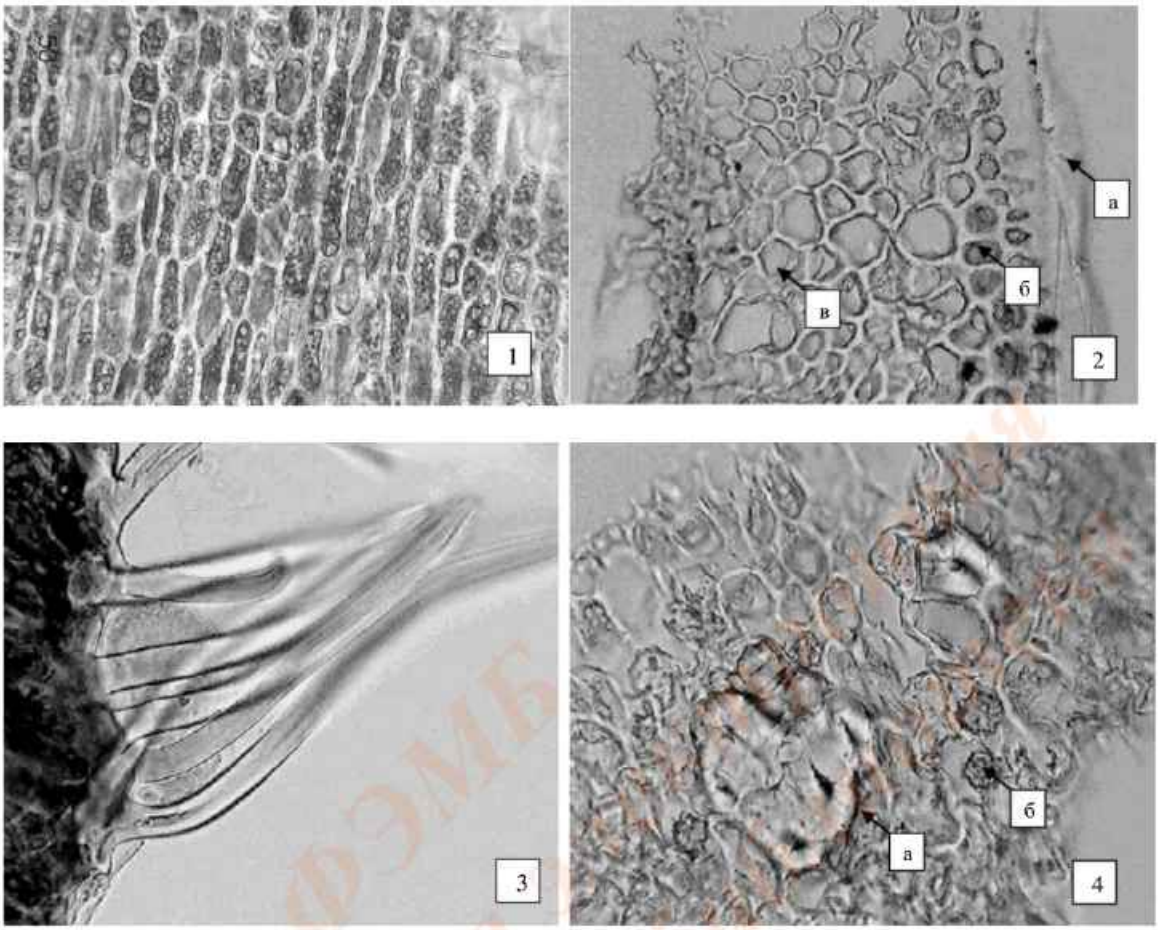


Рисунок – Тополя почки.
1 – фрагмент эпидермиса чешуи (400×); 2 – фрагмент поперечного среза покровной чешуи: кутикула (а), гиподерма с пигментом (б), паренхима (в) (400×); 3 – простые одноклеточные волоски (400×); 4 – фрагмент поперечного среза покровной чешуи: склереиды (а), друзы оксалата кальция (б) (400×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором на алюминиевой подложке размером 10 × 15 см наносят 2 мкл испытуемого раствора (см. раздел «Количественное определение». Сумма фенольных соединений» приготовление раствора А испытуемого раствора) и 2 мкл раствора стандартного образца (СО) пиностробина (см. раздел «Количественное определение». Сумма фенольных соединений» приготовление раствора А СО

пиностробина). Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 1 ч смесью растворителей хлороформ – спирт 96 % (9:1), 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 просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции фиолетового цвета на уровне зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО пиностробина.

Хроматограмму обрабатывают диазореактивом и выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100 – 105 °С в течение 2 мин.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции желто-оранжевого цвета на уровне зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО пиностробина, зона адсорбции оранжевого цвета ниже зоны пиностробина; допускается обнаружение других зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье* – не более 8 %.

Зола общая. *Цельное сырье* – не более 10 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье* – не более 1 %.

Посторонние примеси

Веточки, в том числе отделенные при анализе. *Цельное сырье* – не более 10 %.

Почки, тронувшиеся в рост и распустившиеся. *Цельное сырье* – не более 2 %.

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

Минеральная примесь. *Цельное сырье* – 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:* сумма фенольных соединений в пересчете на пиностробин – не менее 15 %.

Сумма фенольных соединений

Приготовление растворов.

Раствор СО пиностробина. Около 0,02 г (точная навеска) СО пиностробина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 80 мл спирта 96 %, растворяют при перемешивании на водяной бане при температуре 75 °С. Затем содержимое колбы охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор А СО пиностробина).

1,0 мл раствора А СО пиностробина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б СО пиностробина).

Срок годности растворов 30 сут.

Около 1,0 г (точная навеска) цельного сырья помещают в колбу с притертой пробкой вместимостью 100 мл и прибавляют 40 мл спирта 96 %. Колбу закрывают пробкой, взвешивают с погрешностью ± 0,01 г, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 1 ч. Содержимое колбы охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и доводят спиртом 96 % до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр (раствор А испытуемого раствора).

1,0 мл раствора А испытуемого раствора помещают в мерную колбу

вместимостью 50 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора).

1,0 мл раствора Б испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор В испытуемого раствора).

Измеряют оптическую плотность раствора В испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 289 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют спирт 96 %.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО пиностробина в тех же условиях.

Содержание суммы фенольных соединений в пересчете на пиностробин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 40 \cdot 25 \cdot 50 \cdot a_0 \cdot 1 \cdot P \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 1 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 50 \cdot 100 \cdot (100 - W)} \cdot 100,$$

где A – оптическая плотность раствора В испытуемого раствора;
A_0 – оптическая плотность раствора Б СО пиностробина;
a – навеска сырья, г;
a_0 – навеска СО пиностробина, г;
P – содержание основного вещества в СО пиностробина, %;
W – влажность сырья, %.

Допускается содержание суммы флавоноидов в пересчете на пиностробин вычислять с использованием удельного показателя поглощения по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 40 \cdot 25 \cdot 50 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot 1 \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора В испытуемого раствора;
$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения пиностробина при длине волны 289 нм, равный 700;
a – навеска сырья, г;
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».

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Укропа пахучего плоды	**ФС.2.5.0043.15**
Anethi graveolentis fructus	**Взамен ГФ XI, вып. 2, ст. 29**

Собранные зрелые и высушенные плоды культивируемого однолетнего травянистого растения укропа пахучего (огородного) – *Anethum graveolens* L., сем. сельдерейных – *Apiaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Отдельные полуплодики (мерикарпии), реже цельные плоды (вислоплодники) длиной 3 – 7 мм, шириной 1,5 – 4 мм, овальные, слабовыпуклые снаружи и плоские на внутренней стороне; каждый полуплодик с 3 нитевидными спинными ребрами и 2 плоскими крыловидными боковыми.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны: цельные голые овальные полуплодики (мерикарпии) светло-коричневые, коричневато-серые или коричневые, иногда с зеленым оттенком; снаружи – слабовыпуклые, с тремя заметными нитевидными спинными ребрышками более светлого цвета, между которыми располагаются 4 секреторных эфирномасличных канальца; с внутренней стороны – плоские, с 2 выпуклыми полулунными эфирномасличными канальцами, которые могут быть частично разрушены; по краям полуплодика – коричневато-белые, иногда с зеленым оттенком, краевые ребра – крылья; на верхушке мерикарпия заметны остатки пятизубчатой чашечки.

Цвет полуплодиков светло-коричневый, коричневато-серый или коричневый, иногда с зеленым оттенком, с более светлыми спинными ребрами и коричневато-белыми, иногда с зеленым оттенком – краевыми

Федеральный ЭМБ
Медицинская электронная библиотека

ребрами. Запах сильный, ароматный. Вкус водного извлечения сладковато-пряный, несколько жгучий.

Порошок. Смесь кусочков плодов различной формы проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны голые, овальные мерикарпии, как правило, без краевых крыловидных ребер, реже с их остатками или цельные мерикарпии; со спинной стороны – слабовыпуклые, с 3 заметными нитевидными спинными ребрышками более светлого цвета, между которыми располагаются 4 секреторных эфирномасличных канальца; с комиссуральной (брюшной) стороны – плоские, с 2 частично разрушенными полулунными эфирномасличными канальцами; на верхушке мерикарпия редко встречаются остатки пятизубчатой чашечки; отдельные коричневато-белые краевые ребра полулунной формы.

Цвет порошка светло-коричневый, серовато-коричневый или коричневый, иногда с зеленым оттенком, с коричневато-белыми и бежевыми вкраплениями.Запах сильный, ароматный. Вкус водного извлечения сладковато-пряный, несколько жгучий.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* На поперечном срезе мерикарпия видны тангентально вытянутые клетки эпидермиса (экзокарпия) с толстыми стенками; мезокарпий, состоящий из паренхимных клеток с тонкими или слегка утолщенными стенками, в ребрышках видны проводящие пучки с группами механических волокон; в ложбинках расположены эфирномасличные канальцы: 4 – на спинной (выпуклой) стороне и 2 – на брюшной (плоской) стороне, канальцы различных размеров с коричневыми выделительными клетками; эндокарпий, плотно сросшийся с семенной кожурой, заметен в виде темной полосы; семя полукруглой формы; эндосперм семени, состоящий из многоугольных толстостенных клеток, заполненных алейроновыми зернами, каплями жирного масла и мелкими друзами оксалата кальция.

При рассмотрении под микроскопом давленого препарата плода видны фрагменты эпидермиса (экзокарпия) из полигональных тонкостенных клеток с умеренно выраженной четковидной утолщенностью стенок, с устьицами аномоцитного типа, устьица небольшие, встречаются редко; фрагменты мезокарпия из клеток с тонкими, слегка утолщенными стенками; фрагменты эфирномасличных канальцев различного размера с коричневыми выделительными клетками; фрагменты проводящих пучков с группами механических волокон; фрагменты эндокарпия из очень узких поперечных клеток; фрагменты семени, включающие тонкостенные коричневатые клетки семенной кожуры и группы многоугольных толстостенных клеток эндосперма, заполненных алейроновыми зернами, каплями жирного масла и мелкими друзами оксалата кальция; цельный зародыш или его фрагменты.

Порошок. При рассмотрении под микроскопом давленого препарата плода видны фрагменты эпидермиса (экзокарпия) из полигональных тонкостенных клеток с умеренно выраженной четковидной утолщенностью стенок, с устьичным комплексом аномоцитного типа, устьица небольшие, встречаются редко; фрагменты мезокарпия из клеток с тонкими, слегка утолщенными стенками; фрагменты септированных (с поперечными перегородками) эфирномасличных канальцев различного размера с коричневыми выделительными клетками; фрагменты проводящих пучков с группами механических волокон; фрагменты эндокарпия из очень узких поперечных клеток; фрагменты семени, включающие тонкостенные коричневатые клетки семенной кожуры и группы многоугольных толстостенных клеток эндосперма, заполненных алейроновыми зернами, каплями жирного масла и мелкими друзами оксалата кальция; цельный зародыш или его фрагменты.

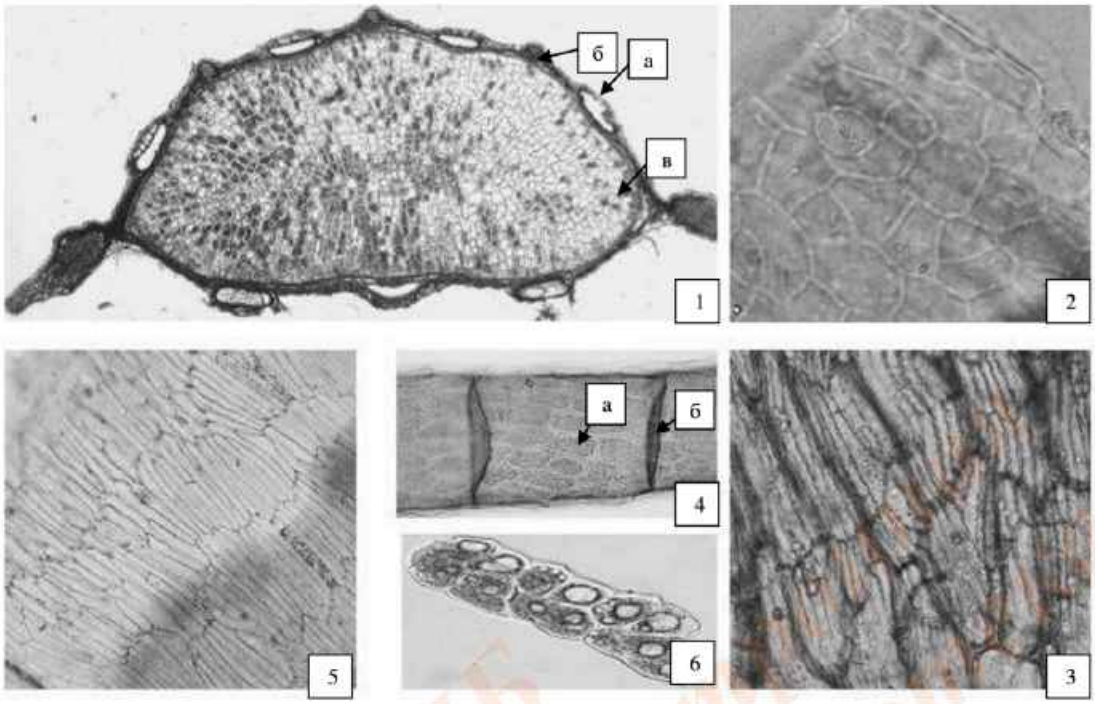


Рисунок – Укропа пахучего плоды.
1 – поперечный срез полуплодика: а – эфирномасличные канальцы,
б – проводящие пучки в ребрышках, в – эндосперм семени (40×);
2 – клетки эпидермиса (экзокарпия) (200×); 3 – паренхима мезокарпия (200×);
4 – фрагмент септированного (с поперечными перегородками)
эфирномасличного канальца: а – коричневые выделительные клетки,
б – поперечные перегородки (200×); 5 – эндокарпий (200×);
6 – клетки эндосперма с мелкими друзами оксалата кальция и каплями
жирного масла (200×)

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) судана III. Около 0,005 г СО судана III растворяют в 10 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор СО ментола. Около 0,01 г СО ментола (левоментола) растворяют в 10 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Анисового альдегида раствор. Смешивают последовательно: 0,5 мл анисового альдегида, 10 мл уксусной кислоты ледяной, 85 мл спирта 96 % и 5 мл серной кислоты концентрированной. Срок годности раствора 30 суток при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около 1,0 г сырья, измельченного до отсутствия цельных плодов,

помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл спирта 96 % и кипятят с обратным холодильником на водяной бане в течение 20 мин. После охлаждения до комнатной температуры извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля на полимерной подложке размером 10 × 10 см в виде полос длиной 10 мм и шириной не более 3 мм наносят 20 мкл испытуемого раствора и рядом по 5 мкл раствора СО судана III и раствора СО ментола.

Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин смесью растворителей толуол – этилацетат (95:5), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры и сушат до удаления следов растворителей. Пластинку обрабатывают анисового альдегида раствором, выдерживают в сушильном шкафу при 100 – 105 °С в течение 2 – 3 мин после чего сразу же просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО судана III должна обнаруживаться зона адсорбции синего или красновато-фиолетового, а на хроматограмме раствора СО ментола должна обнаруживаться зона адсорбции сине-фиолетового или сине-голубого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должно обнаруживаться не менее 3 зон адсорбции (в порядке возрастания): одна из них красного цвета с оранжевым или слабым коричневым оттенком на уровне судана III; вторая - фиолетового или серо-синего цвета выше зоны судана III и над ней зона синего или фиолетово-синего цвета; допускается обнаружение дополнительных зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, порошок* – не более 12 %.

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

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, порошок* – не более 1 %.

Измельченность сырья. *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

Другие части растения. *Цельное сырье* – не более 1 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье* – не более 2 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье, порошок* – не более 1 %.

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:* эфирного масла – не менее 2 %; *порошок:* эфирного масла – не менее 1 %.

Определение эфирного масла проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 2, время перегонки – 2,5 ч).

Около 10,0 г (точная навеска) неизмельченных плодов измельчают в ступке с прибавлением 3,0 г кварцевого песка или битого стекла, предварительно просеянного от пыли сквозь сито с отверстиями размером 0,25 мм, в течение не более 2 мин или измельчают на лабораторной мельнице

до отсутствия цельных плодов, время измельчения – не более 2 мин.

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».

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Фиалки трава	**ФС.2.5.0044.15**
Violae herba	**Взамен ГФ XI, вып. 2, ст. 62**

Собранная в фазу массового цветения и высушенная трава одно- или двухлетних дикорастущих травянистых растений фиалки трехцветной – *Viola tricolor* L. и фиалки полевой – *Viola arvensis Murr.*, сем. фиалковых – *Violaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Смесь цельных или частично измельченных олиственных стеблей с цветками и плодами разной степени развития, отдельных стеблей, листьев, цветков, плодов. Стебли простые или ветвистые, слаборебристые, внутри полые, длиной до 25 см. Листья очередные, обычно черешковые, простые, с 2 крупными лировидными перисторассеченными или перистораздельными прилистниками; нижние – широкояйцевидные, верхние – продолговатые, по краю тупозубчатые или крупногородчатые, длиной до 6 см, шириной до 2 см. Цветки одиночные, неправильные. Чашечки из 5 зеленых овальных или ланцетовидных чашелистиков. Венчик из 5 неравных лепестков, нижний крупнее остальных со шпорцем у основания. У фиалки полевой лепестки короче чашечки или почти равны ей, у фиалки трехцветной – лепестки длиннее чашечки. Плод – одногнездная продолговато-яйцевидная коробочка, раскрывающаяся 3 створками. Семена мелкие, овальные, гладкие.

Цвет листьев – зеленый, стеблей – зеленый, светло-зеленый или желтовато-зеленый, верхних лепестков у фиалки трехцветной – темно-фиолетовый, светло-фиолетовый или синий, у фиалки полевой – светло-

желтый или белый, иногда слабо-фиолетовый, средних лепестков у фиалки трехцветной – фиолетовый, сине-фиолетовый или желтый, у фиалки полевой – светло-желтый, нижних лепестков у фиалки трехцветной – желтый с 5 – 7 темными продольными полосами, по краю фиолетовый, у фиалки полевой – желтый, у основания с 5 – 7 темными продольными полосами, по краю светло-желтый; плодов – зеленый, желтовато-зеленый, зеленовато-желтый; семян – светло-коричневый. Запах слабый. Вкус водного извлечения сладковатый, слизистый.

Измельченное сырье. Смесь кусочков стеблей, листьев, цветков, плодов различной формы, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет от светло-зеленого до зеленого с желтовато-белыми, светло-желтыми, синими, фиолетовыми, желтовато-зелеными, зеленовато-желтыми, светло-коричневыми вкраплениями. Запах слабый. Вкус водного извлечения сладковатый, слизистый.

Порошок. Смесь кусочков стеблей, листьев, цветков, плодов, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Цвет от светло-зеленого до зеленого с желтовато-белыми, светло-желтыми, синими, фиолетовыми, желтовато-зелеными, зеленовато-желтыми, светло-коричневыми вкраплениями. Запах слабый. Вкус водного извлечения сладковатый, слизистый.

Микроскопические признаки. *Цельное, измельченное сырье.* При рассмотрении препаратов листа и чашелистика с поверхности должно быть видно, что клетки верхнего эпидермиса со слабоизвилистыми стенками, нижнего – с более извилистыми. Устьица расположены на верхнем и нижнем эпидермисе, окружены 3 – 4 околоустьичными клетками (аномоцитный тип). Замыкающие клетки устьиц имеют почковидную форму. Волоски 2 типов – простые и головчатые. Простые волоски одноклеточные, нежно-бородавчатые, с толстыми стенками, расширены у основания и заострены на конце, располагаются преимущественно на жилках и по краю листа. Головчатые волоски с многоклеточной головкой на широкой

многоклеточной ножке, встречаются только по краю листа, в углублениях между зубцами. В мезофилле листа видны многочисленные крупные друзы оксалата кальция. При рассмотрении лепестков с поверхности видны клетки верхнего эпидермиса с сосочковидными выростами. На эпидермисе средних и нижних лепестков, у основания, располагаются длинные одноклеточные тупоконечные волоски с тонкими стенками. На нижнем лепестке, при входе в шпорец располагаются извилистые длинные одноклеточные бугорчатые волоски. В паренхиме нижней части лепестков встречаются друзы оксалата кальция.

Клетки эпидермиса стебля прямые, вытянутые по длине. Волоски эпидермиса стебля простые, многоклеточные, заостренные на верхушке.

Створка плода на поперечном срезе состоит из центральной части и 2 крыльев. Экзокарпий створки образуют 3 – 5 рядов тонкостенных клеток эпидермиса. При рассмотрении с поверхности клетки имеют удлиненную форму и прямые стенки, встречается множество устьиц аномоцитного типа. Мезокарпий центральной части состоит из 2 слоев склеренхимных волокон с пористыми одревесневшими стенками и паренхимы. Волокна верхнего слоя сильно утолщены и вытянуты параллельно поверхности створки, волокна нижнего слоя имеют менее выраженное утолщение и расположены перпендикулярно ее поверхности. Под склеренхимой в окружении паренхимы располагается несколько проводящих пучков. Паренхима состоит из нескольких слоев клеток с толстыми стенками, округлых на поперечном срезе. В нижних слоях обнаруживаются друзы и скопления мелких призматических кристаллов оксалата кальция. Внутренняя поверхность створки плода (эндокарпий) состоит из одного ряда клеток эпидермиса прямоугольной формы со слегка волнистыми или прямыми стенками на продольном срезе. Крыло створки образовано мощным слоем склеренхимных пористых толстостенных волокон, вытянутых параллельно его поверхности. В слое экзокарпия в месте соединения крыла и центральной части

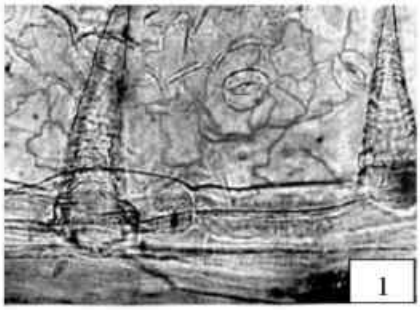
располагается проводящий пучок. В состав проводящих пучков створки входят спиральные, кольчатые, лестничные и сетчатые сосуды.

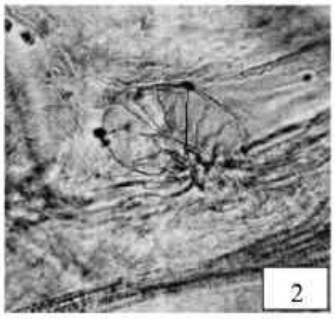
При рассмотрении поперечного среза семени должны быть видны кожура в виде желтой или светло-коричневой полосы, эндосперм и зародыш. При большом увеличении различают слои семенной кожуры. В давленом препарате эпидермис состоит из клеток изодиаметрической формы с прямыми стенками, покрытых толстым слоем кутикулы и содержащих слизь. Некоторые из клеток имеют сетчатое утолщение. Под эпидермисом располагается пигментный слой, состоящий в давленом препарате из клеток удлиненно-прямоугольной формы с прямыми стенками, содержащих окрашивающий пигмент желтого или светло-коричневого цвета. К нему примыкает слой округлых клеток с утолщенными стенками, содержащих призматические кристаллы оксалата кальция, и далее слой, состоящий из толстостенных склеренхимных плотно сомкнутых волокон, вытянутых параллельно поверхности семени. Под ним находится слой, образованный на поперечном срезе из одного ряда паренхимных клеток.

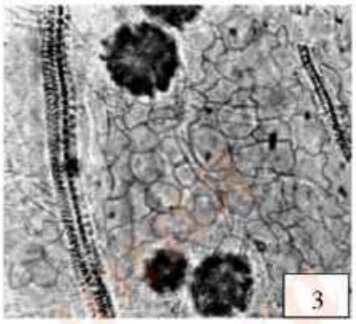
Клетки эндосперма тонкостенные, изодиаметрической формы и содержат капли жирного масла (реакция с суданом III) и мелкие алейроновые зерна. Самый наружный слой эндосперма состоит из мелких толстостенных клеток.

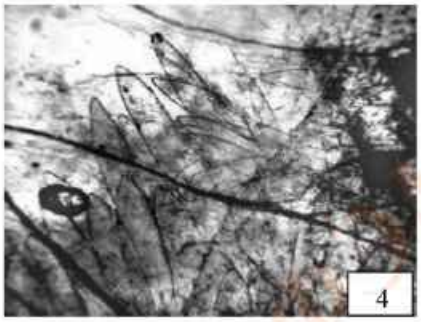
Порошок. При рассмотрении порошка обоих видов должны быть видны фрагменты клеток эпидермиса листьев и чашелистиков с извилистыми стенками и с устьицами аномоцитного типа, окруженными 3 – 4 околоустьичными клетками, замыкающие клетки устьиц имеют почковидную форму; простые одноклеточные, толстостенные, нежно-бородавчатые волоски с расширенным основанием и заостренной верхушкой; головчатые волоски с многоклеточной головкой на широкой многоклеточной ножке; фрагменты мезофилла листа с многочисленными друзами оксалата кальция; фрагменты венчика цветка с извилистыми эпидермальными клетками, сосочковидными выростами клеток эпидермиса, длинными

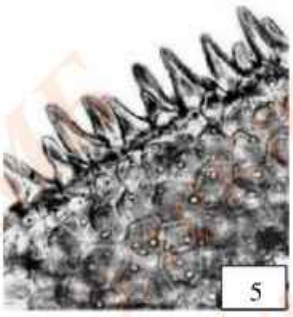
одноклеточными извилистыми бугорчатыми волосками и друзами оксалата кальция в паренхиме; редкие фрагменты спиральных и сетчатых сосудов и групп волокон из стебля.

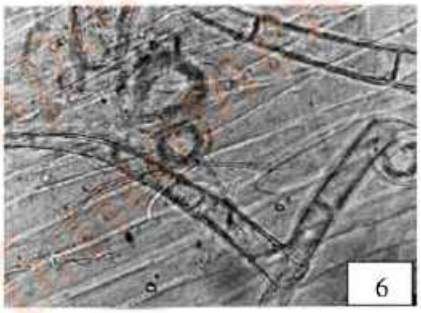

1

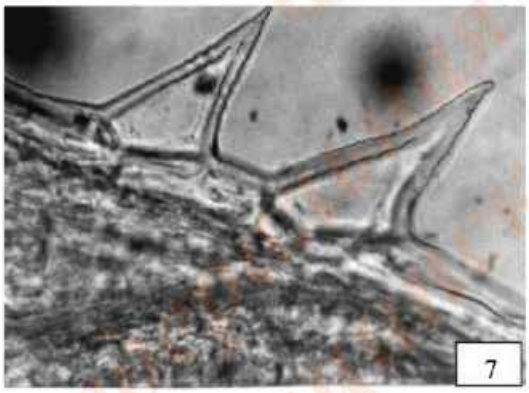

2


3


4


5


6


7

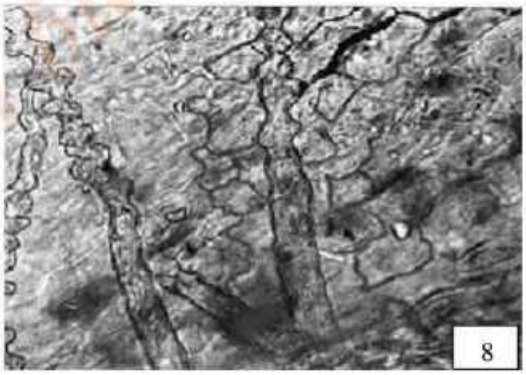

8

Рисунок – Фиалки трава.
1 – фрагмент эпидермиса листа с простыми одноклеточными нежно-бородавчатыми волосками и устьицами аномоцитного типа (200×), 2 – фрагмент края листа с головчатым волоском (200×), 3 – фрагмент эпидермиса листа с жилкой и друзами оксалата кальция (200×), 4 – фрагмент эпидермиса лепестков венчика цветка с тупоконечными простыми одноклеточными волосками (200×), 5 – фрагмент верхнего эпидермиса лепестков венчика цветка с сосочковидными выростами (200×), 6 – фрагмент эпидермиса стебля с простыми многоклеточными волосками (200×), 7 – фрагмент эпидермиса чашечки цветка с простыми одноклеточными нежно-бородавчатыми волосками (200×), 8 – фрагмент эпидермиса лепестков венчика цветка с извилистыми длинными одноклеточными бугорчатыми волосками (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

1. ***Тонкослойная хроматография***

Приготовление растворов

Раствор стандартного образца (СО) рутина. Около 0,005 г рутина (рутина тригидрата) растворяют в 10 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Дифенилборилоксиэтиламина раствора 1 % в спирте 96 %. 1,0 г дифенилборилоксиэтиламина (дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира) растворяют в 100 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Полиэтиленгликоля (ПЭГ) раствора 5 % в спирте 96 %. 5 мл полиэтиленгликоля-400 смешивают со 100 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 6 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около 1,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл спирта 96 %, нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 5 мин, затем извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля на полимерной подложке размером 10 × 10 см в виде полос длиной 10 мм, шириной не более 3 мм наносят 10 мкл испытуемого раствора и параллельно 5 мкл раствора СО рутина. Пластинку с нанесенными пробами

сушат при комнатной температуре в течение 5 мин, помещают в камеру предварительно насыщенную в течение 40 мин смесью растворителей этилацетат - муравьиная кислота безводная - вода (65:15:20) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры и сушат до удаления следов растворителей (под тягой при комнатной температуре). Затем хроматограмму обрабатывают последовательно дифенилборилоксиэтиламина раствором 1 % в спирте 96 % и ПЭГ раствором 5 % в спирте 96 %, выдерживают в сушильном шкафу при 105-110 °С в течение 3-5 мин.

Затем хроматограмму рассматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО рутина должна обнаруживаться зона с флюоресценцией желто-оранжевого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должно обнаруживаться не менее двух зон: зона с флуоресценцией ярко-желтого цвета ниже зоны рутина и зона с флуоресценцией желто-оранжевого цвета примерно на уровне зоны рутина. Допускается наличие дополнительных 3-4 зон, в том числе зоны желтой флуоресценции выше зоны рутина.

2. К 5 мл раствора А (см. раздел «Количественное определение. Полисахариды») прибавляют 15 мл спирта 96 %; выпадает объемистый осадок (полисахариды).

ИСПЫТАНИЯ

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

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 13 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 3 %.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 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

Пожелтевшие листья и стебли/кусочки листьев и стеблей. *Цельное сырье*, *измельченное сырье* – не более 7 %.

Другие части растения (плоды, створки плодов, корней). *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3 %.

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

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:* сумма флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 1 %, сумма

полисахаридов – не менее 8 %, экстрактивных веществ, извлекаемых водой, – не менее 30 %.

Сумма флавоноидов

Приготовление растворов.

Раствор СО рутина. Около 0,1 г (точная навеска) СО рутина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 85 мл спирта 70 % и нагревают на водяной бане до полного растворения. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора до метки тем же спиртом и перемешивают (раствор А СО рутина). Срок годности раствора 3 мес.

1,0 мл раствора А СО рутина, 5 мл алюминия хлорида раствора 5 % в спирте 70 %, 1 мл уксусной кислоты раствора 3 % (прибавленного через 10 мин), помещенных в мерную колбу вместимостью 25 мл, доведенных спиртом 70 % до метки (раствор Б СО рутина).

Алюминия хлорида раствор 5 % в спирте 70 %. 5,0 г алюминия хлорида растворяют в 40 мл спирта 70 % в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл спирта 70 % и взвешивают с погрешностью ± 0,01 г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на кипящей водяной бане в течение 45 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Затем колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и, при необходимости, доводят до первоначальной массы спиртом 70 %. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр, смоченный тем же спиртом, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А испытуемого раствора).

2,0 мл раствора А испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл алюминия хлорида раствора 5 % в спирте 70 % и через 10 мин – 1 мл уксусной кислоты раствора 3 %, доводят объем раствора тем же спиртом до метки, перемешивают (раствор Б испытуемого раствора).

Оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора измеряют через 30 мин на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2 мл раствора А испытуемого раствора, 1 мл уксусной кислоты раствора 3 %, доведенный спиртом 70 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО рутина. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл раствора А СО рутина, 1 мл уксусной кислоты раствора 3 %, доведенный спиртом 70 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot a_0 \cdot 1 \cdot P \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 2 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100 \cdot (100 - W)} \cdot 100,$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
A_0 – оптическая плотность раствора Б СО рутина;
a – навеска сырья, г;
a_0 – навеска СО рутина, г;
P – содержание основного вещества в СО рутина, %;
W – влажность сырья, %.

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

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 2 \cdot (100 - W)}$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при длине волны 410 нм, равный 249;
a – навеска сырья, г;
W – влажность сырья, %.

Полисахариды.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Около 10,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 500 мл, прибавляют 200 мл воды очищенной, нагретой до кипения. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и кипятят при перемешивании на электрической плитке в течение 30 мин. Экстракцию повторяют ещё 2 раза, используя по 200 мл и 100 мл воды соответственно.

Водные извлечения объединяют и фильтруют в мерную колбу вместимостью 500 мл через 5 слоёв марли, вложенной в стеклянную воронку и предварительно промытой водой очищенной. Фильтр промывают водой и доводят объём раствора тем же растворителем до метки (раствор А).

25,0 мл раствора А помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 75 мл спирта 96 %, перемешивают, подогревают на водяной бане в течение 30 мин. Содержимое колбы фильтруют через предварительно высушенный и взвешенный беззольный бумажный фильтр. Осадок на фильтре последовательно промывают 15 мл раствора спирта 96 % в воде очищенной (3:1), 10 мл смеси этилацетата и спирта 96 % (1:1). Фильтр с осадком высушивают сначала на воздухе, затем при температуре 100 - 105 °С до постоянной массы.

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

$$X = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 500 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot 25 \cdot (100 - W)},$$

где m_1 – масса фильтра, г;
m_2 – масса фильтра с осадком, г;
a – навеска сырья, г;
W – влажность, %.

Экстрактивные вещества. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном

растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1, навеска сырья 1,0 г, экстрагент – вода очищенная.).

Примечание

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и экстрактивных веществ, извлекаемых водой, определяют в траве фиалки, предназначенной для получения водных извлечений; содержание экстрактивных веществ, извлекаемых водой, и суммы полисахаридов определяют в траве фиалки, предназначенной для получения водно-спиртовых экстрактов.

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».

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Хвоща полевого трава	**ФС.2.5.0045.15**
Equiseti arvensis herba	**Взамен ГФ XI, вып. 2, ст. 50**
	(изм. № 2 от 20.08.1997)

Собранные в течение лета и высушенные надземные вегетативные побеги многолетнего травянистого дикорастущего растения хвоща полевого – *Equisetum arvense* L., сем. хвощевых – *Equisetaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Цельные и частично измельченные стебли длиной до 30 см, жесткие, членистые, бороздчатые, с 6 – 18 продольными ребрышками, почти от основания мутовчато-ветвистые, с полыми междоузлиями и утолщениями в узлах. Ветви неразветвленные, членистые, косо вверх направленные, 4–5-гранные, без полости. Влагалища стеблей цилиндрические, длиной 4 – 8 мм, с треугольно-ланцетными, темно-коричневыми, белоокаймленными по краю зубцами, спаянными по 2 – 3. Влагалища веточек зеленые с 4 – 5 коричневатыми длинноottянутыми зубчиками. При обрывании ветвей на стебле удерживаются только первые короткие членики.

Цвет серовато-зеленый. Запах слабый. Вкус водного извлечения слегка кисловатый.

Измельченное сырье. Кусочки стеблей и ветвей частично с узлами и влагалищами, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки ветвей, четырех–пятиребристых, без полости на срезе, без листовых влагалищ, иногда с влагалищами или с их остатками. Отдельно

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

встречаются целые влагалища и их части. Влагалища стеблей – зубчатые трубочки, серовато-зеленые, коричневые и темно-коричневые со спаянными по 2 – 3 треугольно-ланцетными коричневыми зубцами; влагалища ветвей – серовато-зеленые с длиннозаостренными зубцами, светло коричневыми, зелеными или зелеными со светло коричневой каймой. Реже встречаются кусочки стебля (междоузлия и узлы) в поперечном и продольном сечении. Кусочки стебля в поперечном сечении ребристо-бороздчатые с центральной крупной полостью и мелкими полостями (под бороздами).

В продольном сечении кусочки стебля (междоузлия), с одной стороны – ребристые серовато-зеленые, с другой – гладкие, слегка продольно слоистые, блестящие светло-желтые. Кусочки стебля, соответствующие узлам, с одним или несколькими мелкими коричневыми влагалищами ветвей. При рассматривании полости узла может быть видна перегородка или ее остаток.

При рассмотрении под стереомикроскопом (32×) видна поверхность кусочков ветвей, стеблей, влагалищ серовато-зеленого цвета, покрытая мелкими беловатыми сосочками. Гребни ребер с беловатыми зубчатыми выростами. На большинстве кусочков, у основания ребер вдоль бороздок, расположены 2 – 2 (реже 1, 4) ряда более крупных, чем сосочки, беловатых образований с лучистой складчатостью поверхности – устьица. Замыкающие клетки устьиц расположены на уровне клеток эпидермиса. Кусочки стеблей в продольном сечении, с одной стороны – ребристые, зеленые, с беловатыми зубчатыми гребнями, с другой – продольно-слоистые, светло-желтые, блестящие. На поперечном сечении кусочков стебля, в коре под бороздками, видны полости.

Цвет серовато-зеленый, желтовато-зеленый со светло-желтыми и коричневыми вкраплениями. Запах слабый. Вкус водного извлечения слегка кисловатый.

Порошок. Кусочки стеблей, ветвей, влагалищ, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

При рассмотрении под стереомикроскопом (32×) видны мелкие беловатые сосочки. Вдоль бороздок расположены 2 – 3 (реже 1 – 4) ряда более крупных, чем сосочки, беловатых образований с лучистой складчатостью поверхности – устьица. Замыкающие клетки устьиц расположены на уровне клеток эпидермиса. Кусочки ветвей в поперечном сечении с 4 – 5 ребрами, без полости. Гребни ребер с зубчатыми выростами. Видны отдельные зубцы (редуцированные листья) стеблевых влагалищ, треугольно-ланцетные плоские, спаянные или не спаянные, коричневые.

Цвет порошка серовато-зеленый с желтоватыми, беловатыми и коричневатыми вкраплениями. Запах слабый. Вкус водного извлечения слегка кисловатый.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье, измельченное сырье.* При рассмотрении с поверхности эпидермиса стебля, ветвей, листовых влагалищ и зубцов (редуцированных листьев) должны быть видны клетки на ребрах, сильно удлиненные (вытянутые по оси роста) с утолщенными прямыми или слегка извилистыми, пористыми стенками. Клетки в бороздках короче, их длинные стенки извилистые (угловато и округло зазубренные), пористые. На коротких стенках (стыках) клеток эпидермиса, расположенных на вершине ребер (гребнях), видны выросты, имеющие (с поверхности) вид спаренных кружочков с ясно выраженной перегородкой. При рассмотрении выростов сбоку видно, что на стеблях зубцы иногда сглаженные (закругленные), на ветвях зубцы наклонные, острые, перегороженные. На поверхности клеток эпидермиса ребер также имеются многочисленные мелкие сосочковидные выросты. Устьица расположены в основании ребер обычно в 2 – 3 ряда (реже в 4 и 1 ряд) и сопровождают бороздку. Они слегка погруженные, с характерной лучистой складчатостью кутикулы. У зубцов с наружной стороны над жилкой расположен ряд парных устьиц, иногда с внутренней стороны, на верхушке над жилкой имеется крупное устьице (гидатода).

На поперечном срезе стебля под эпидермисом в ребрах и в бороздках должны быть видны участки округлых клеток с утолщенными стенками (колленхима).

Клетки паренхимы округлые, тонкостенные, наружный слой хлорофиллоносный (хлоренхима) образует сплошное кольцо, внутренний рыхлый, в нем под бороздками располагаются крупные полости. Проводящие пучки закрытые (без камбия), расположены в 1 ряд под ребрами, отделены от коры слабозаметной эндодермой и имеют небольшую полость. Центральная часть стебля (междоузлия) полая. На поперечном и продольном срезах стебля в области узла видна разделительная перегородка центральной полости соседних междоузлий. На продольных срезах стебля видны тяжи механической ткани (колленхима), расположенной в ребрах и бороздках. Клетки колленхимы узкие, длинные с пропитанной кремнеземом стенкой. Сосуды древесины междоузлий с кольчатым утолщением стенок по длине равны междоузлию. Флоэма состоит из ситовидных элементов и паренхимы. В узлах, по сравнению с междоузлиями, возрастает количество ксилемы. Сосуды здесь короткие, почти изодиаметрические с сетчатыми, пористыми (простыми или окаймленными порами) стенками.

Порошок. При рассмотрении микропрепаратов порошка должны быть видны кусочки, чаще в продольном и реже в поперечном сечении, ветвей, стеблей, влагалищ и зубцов. Клетки эпидермиса с сильно удлиненными, прямыми или слегка извилистыми, утолщенными, пористыми стенками или с удлиненными, сильноизвилистыми, пористыми стенками. На коротких стенках (стыках) клеток эпидермиса, соответствующих гребням, видны выросты, с поверхности имеющие вид спаренных кружочков, при рассмотрении сбоку они закругленные или зубчатые с ясно выраженной перегородкой. Поверхность большинства клеток с мелкими сосочковидными выростами. Должны быть видны фрагменты эпидермиса со слегка погруженными устьицами, имеющими характерную лучистую складчатость кутикулы. На некоторых кусочках устьица частично разрушены или вместо

них видны овальные отверстия. На кусочках ветвей продольного сечения, соответствующих наружной поверхности, видны эпидермис с зубчатыми и сосочковидными выростами и устьица с лучистой складчатостью. На кусочках ветвей продольного сечения, соответствующих внутренней части, видна рыхлая сердцевина с клетками, содержащими хлорофилл, по краям могут быть видны зубчатые и мелкие сосочковидные выросты или выпуклые с лучистой складчатостью устьица. Видны части влагалищ и зубцов с центральной жилкой, над которой располагаются парами по всей длине жилки, устьица с лучистой складчатостью. На верхушках зубцов иногда видны крупные устьица.

На кусочках продольного сечения стебля видны группы сосудов ксилемы с различным утолщением стенок (спиралевидным, кольчатым, сетчатым, реже пористым).

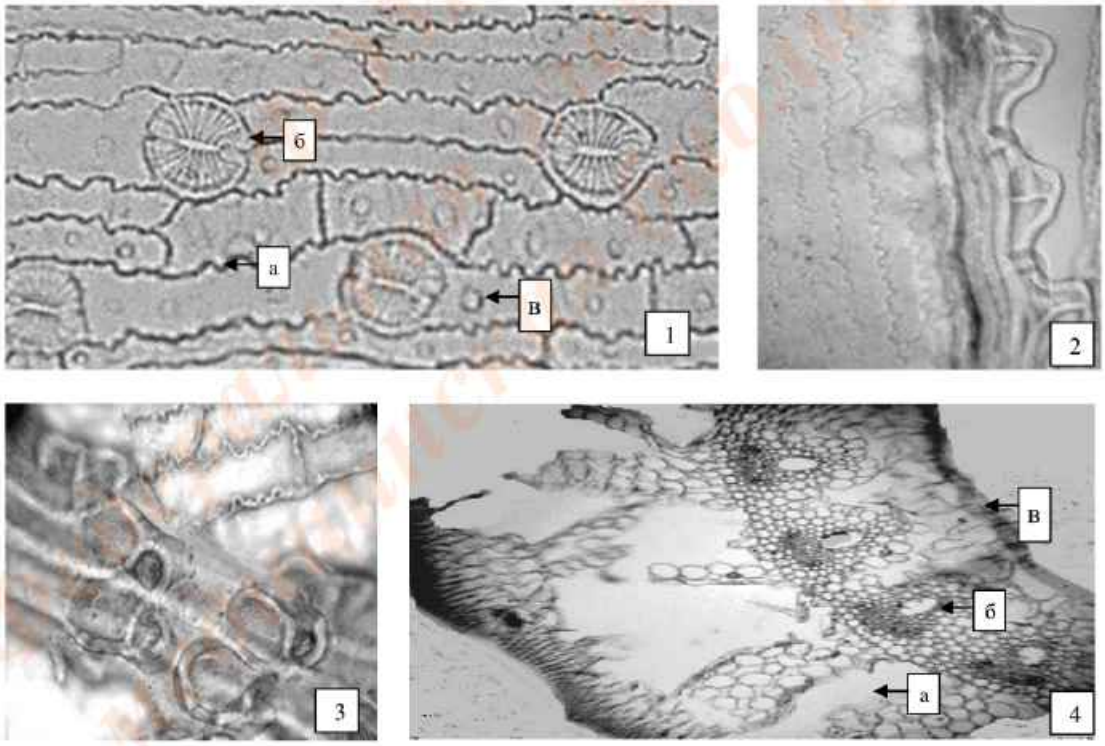


Рисунок – Хвоща полевого трава.
1 – фрагмент эпидермиса членика веточки: а – сильноизвилистые стенки эпидермиса, б – устьица с характерной складчатостью кутикулы, в – сосочковидные выросты (200×); 2 – выросты на ребре членика веточки (вид с боку) (200×); 3 – выросты на ребре членика веточки (вид сверху)

(200×); 4 – фрагмент поперечного сечения стебля: а – крупная полость (в коре), б – проводящий пучок (с маленькой полостью), в – эндодерма (100×).

Примечание.

К другим видам хвощей, встречающимся в сырье как примесь, относят:

а) *Хвощ лесной* (*Equisetum sylvaticum* L.) имеет нежесткий стебель с вторично ветвящимися, отклоненными вниз, тонкими ветвями. В верхней части стебля на ребрах в стереомикроскоп (32×) заметны 2 ряда роговидных выростов (шипиков). Зубцы влагалищ на стебле сросшиеся и в сырье легко обламываются. Веточки с 3 – 5 ребрами. На верхушках встречаются тупые колоски. При рассмотрении эпидермиса стебля с поверхности в бороздках видны один (два) ряда устьиц. Ребра гладкие, но местами по краям заметны крупные выросты в виде зубцов или сосочков. Стенки клеток ребер ветвей слабоволнистые.

б) *Хвощ луговой (Equisetum pratense* L.) имеет ветви с почти горизонтальным расположением, дуговидно книзу отогнутые. Зубцы влагалищ неспаянные. На верхушках стеблей могут быть тупые колоски. В верхней части стебля по ребрам видны множественные, острые конусовидные выросты (сосочки), хорошо заметные под лупой (10×) или в стереомикроскоп (32×). Веточки с 3 ребрами. Под микроскопом видно, что выросты на эпидермисе ребрышек расположены в несколько рядов. В бороздках один, реже два ряда устьиц. Стенки клеток ребер ветвей слегка волнистые. На стеблях имеются поперечные кольчатые выросты.

в) *Хвощ речной* (синонимы топяной, приречный) (*Equisetum fluviatile* L.) имеет мощный стебель толщиной около 0,5 см и высотой от 20 до 150 см. На верхушках стеблей встречаются тупые колоски. При рассмотрении под лупой (10×) видно, что ветви очень короткие, малочисленные или отсутствуют. При рассмотрении в стереомикроскоп (32×) видно, что влагалища с многочисленными зубцами (от 18 до 20). При рассмотрении эпидермиса стебля под микроскопом с поверхности видны гладкие ребра, чередующиеся с широкими бороздами, несущими по 10 – 12 рядов устьиц в ширину. По краю ребер видны зубцы.

г) *Хвощ болотный* (*Equisetum palustre* L.). На верхушке стеблей могут быть тупые колоски. При рассмотрении под лупой (10×) видно, что стеблевые влагалища с неспаянными, снабженными широкой белой каймой зубцами, влагалища ветвей на стебле черного цвета. При отрывании ветвей на стебле удерживаются не только влагалища, но и первые членики. Поверхность стеблей и ветвей поперечно–морщинистая. Под микроскопом при рассмотрении эпидермиса стебля и ветвей с поверхности видны устьица, расположенные несколькими рядами. Ребра стеблей и ветвей несут заостренные зубцы. На поперечном срезе ветвей имеется центральная полость, у стебля отсутствует колленхима в бороздках.

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Около 2,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещают в плоскодонную коническую колбу со шлифом вместимостью 50 мл, прибавляют 20 мл спирта 96 %, настаивают в закрытой колбе при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем колбу с содержимым присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин, охлаждают до комнатной температуры и фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором на алюминиевой подложке размером 20 × 20 см наносят 20 мкл испытуемого раствора. Пластинку с нанесенной пробой сушат, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 30 мин смесью растворителей хлороформ – метанол (3:1), 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 просматривают в УФ-свете при придлне волны 254 и 365 нм).

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться не менее 2 зон адсорбции с флуоресценцией ярко-голубого и красного цвета в УФ-свете при 254 нм или с флуоресценцией фиолетово-голубого и ярко-красного цвета в УФ-свете при 365 нм; допускается обнаружение других зон адсорбции (флавоноиды).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 13 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 24 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 12 %.

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 7 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 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

Другие части растения (корневища, корни). *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1 %.

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:* суммы флавоноидов в пересчете на кверцетин – не менее 0,3 %.

Сумма флавоноидов

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих через сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в круглодонную колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл спирта 96 %, содержащего 2,0 мл хлористоводородной кислоты 10 %. Колбу с содержимым присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. После охлаждения полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл, так чтобы частицы сырья не попали на фильтр. Экстрагирование повторяют дважды в описанных выше условиях. Извлечения фильтруют в ту же мерную колбу. После охлаждения объем доводят спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор А).

1,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, 4 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 %, 3 капли хлористоводородной кислоты раствора 10 % и доводят объем раствора спиртом 96 % до метки (раствор Б).

Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре при длине волны 430 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм через 30 мин. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл раствора А, 3 капель хлористоводородной кислоты раствора 10 % и доведенный спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на кверцетин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б;

$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения кверцетина при длине волны 430 нм, равный 764,6;

a – навеска сырья, г;

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».

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Хмеля обыкновенного соплодия	**ФС.2.5.0046.15**
Humuli lupuli fructus	**Взамен ФС 42-0147-05**

Собранные в начале созревания и высушенные соплодия многолетнего культивируемого и дикорастущего травянистого растения хмеля обыкновенного – *Humulus lupulus* L., сем. коноплевых – *Cannabaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Смесь соплодий шаровидных, овально-цилиндрических продолговатых или яйцевидных длиной от 2,5 до 5,0 см и шириной 1,5 – 2 см. Соплодия состоят из сидячих овальных или яйцевидных прицветных чешуй длиной 1 – 1,5 см, шириной 0,15 – 0,9 см, черепитчато-расположенных на коленчатой оси (стерженьке). Жилкование прицветных чешуй дугонервное, переходящее к верхушке в сетчатонервное. Край прицветных чешуй цельный, верхушка заостренная. У основания прицветные чешуи имеют складку, где размещается плод – округлый приплюснутый орешек коричневого или коричнево-фиолетового цвета длиной 2 – 3 мм, шириной 2 мм. Плод и основание прицветных чешуй покрыты мелкими блестящими смолистыми, легко отделяемыми лупулиновыми железками оранжево-желтого цвета. При рассмотрении сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) заметно опушение прицветных чешуй с обеих сторон, с нижней стороны жилки выпуклые, покрыты более длинными волосками, стерженьки также опушены. Плод округлый, с гладкой, блестящей поверхностью или покрыт железками, имеет острую верхушку и 2 ребрышка по бокам. Цвет соплодий желтовато-

зеленый, золотисто-зеленый, зеленовато-желтый или желтовато-коричневый, прицветные чешуи могут иметь светло-коричневые кончики. Запах специфический, ароматно-бальзамический. Вкус водного извлечения горький и жгучий.

Измельченное сырье. Смесь частиц соплодий от желтого, желтовато-зеленого, зеленого до желтовато-коричневого цвета, различной формы, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм. При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки опушенных прицветных чешуй, стерженьков, лупулиновые железки, встречающиеся иногда на прицветных чешуях, чаще – отдельно поодиночке или слипшись по несколько штук, изредка плоды. Запах специфический, ароматно-бальзамический. Вкус водного извлечения горький и жгучий.

Порошок. Смесь частиц соплодий от желтого, желтовато-зеленого, зеленого до желтовато-коричневого цвета различной формы, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. При рассмотрении порошка под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки опушенных прицветных чешуй и стерженьков, изредка плодов с гладкой поверхностью или покрытых железками, отдельно лупулиновые железки, одиночные или слипшиеся в комочки. Запах специфический, ароматно-бальзамический. Вкус водного извлечения горький и жгучий.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье, измельченное сырье.* При рассмотрении микропрепаратов частиц прицветных чешуй с поверхности должны быть видны клетки с извилистыми тонкими стенками и складчатой кутикулой, местами клеточные стенки с неравномерным утолщением (верхний эпидермис), немногочисленные устьица аномоцитного типа (нижний эпидермис). Клетки, расположенные вдоль жилок и по краю прицветных чешуй, несколько вытянуты и имеют утолщенные стенки. Трихомы представлены волосками: головчатыми с 1–2-клеточной ножкой и 1–4-клеточной головкой, часто встречающимися одноклеточными тонкостенными волосками с заостренным концом, реже 3–4-клеточными. По

краю прицветных чешуй расположены простые одноклеточные волоски с расширенным основанием.

Железки, часто отделенные от поверхности чешуй, состоят из 1–2-клеточной ножки и головки из большого числа многоугольных тонкостенных клеток. В мезофилле прицветных чешуй находятся друзы оксалата кальция, чаще вблизи жилок, а также клетки губчатой паренхимы с крупными межклетниками (аэренхима). В давленом препарате плода встречаются фрагменты околоплодника с извилистыми клетками экзокарпия.

Порошок. При рассмотрении микропрепаратов должны быть видны фрагменты эпидермиса с устьицами аномоцитного типа, железками, состоящими из 1–2-клеточной ножки и многоклеточной головки, многочисленными простыми одноклеточными и головчатыми волосками с 1–2-клеточной ножкой и 1–4-клеточной головкой, трихомы часто отделены от эпидермиса; фрагменты околоплодника с извилистыми утолщенными стенками экзокарпия.

В фрагментах мезофилла видны друзы оксалата кальция, иногда клетки губчатой паренхимы с крупными межклетниками (аэренхима). В мелкой фракции порошка встречаются фрагменты околоплодника, отдельные железки, фрагменты паренхимы с друзами оксалата кальция, отдельно лежащие простые и головчатые волоски.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

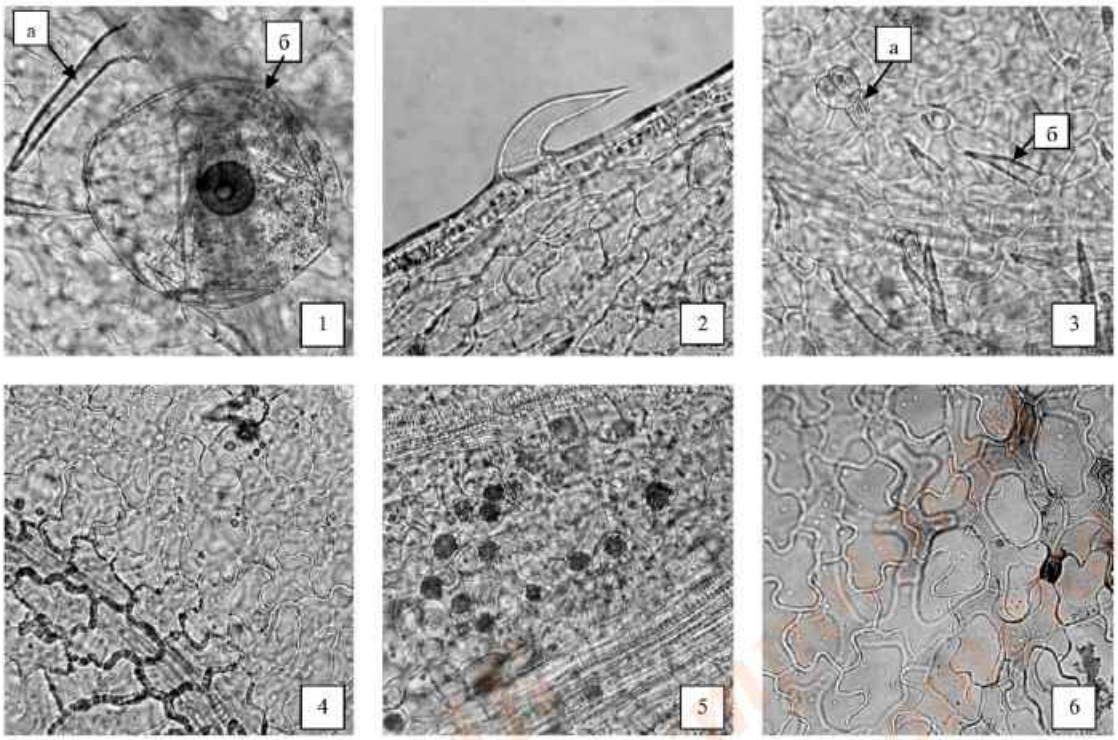


Рисунок – Хмеля обыкновенного соплодия.
1 – простой одноклеточный волосок (а) и железка (б) на нижнем эпидермисе (200×); 2 – простой одноклеточный волосок с расширенным основанием (200×); 3 – головчатый волосок (а) и одноклеточные тонкостенные волоски с заостренным концом (б) (200×); 4 – клетки верхнего эпидермиса с утолщенными извилистыми стенками вдоль жилки (200×); 5 – друзы оксалата кальция (200×); 6 – губчатая паренхима с крупными межклетниками (аэренхима) (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

1. Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор для детектирования 1. Дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира спиртовой раствор 1 %. 1,0 г дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира растворяют в 100 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор для детектирования 2. Полиэтиленгликоля (ПЭГ) 400 спиртовой раствор 5 %. 5 мл ПЭГ 400 смешивают со 100 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 6 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор стандартного образца (СО) рутина. Около 0,005 г СО рутина растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в плотно укупоренной упаковке в защищенном от

света месте.

Раствор СО гиперозида. Около 0,001 г СО гиперозида растворяют в 2 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в плотно укупоренной упаковке в прохладном, защищенном от света месте.

На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля на алюминиевой подложке размером 10 × 10 см в виде полос длиной 10 мм, шириной не более 2 мм наносят 30 мкл испытуемого раствора (см. раздел «Количественное определение. Сумма флавоноидов» приготовление раствора А испытуемого раствора) и параллельно в одну полосу по 1 мкл раствора СО рутина и раствора СО гиперозида. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 60 мин смесью растворителей этилацетат – уксусная кислота ледяная – вода (5:1:1), 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. Затем пластинку выдерживают при 100 – 105 °С в течение 5 – 10 мин и теплую обрабатывают раствором для детектирования 1, сушат, а затем обрабатывают раствором для детектирования 2, после полного удаления следов растворителей пластинку просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО рутина должна обнаруживаться зона адсорбции желтого или желто-зеленого цвета, на хроматограмме раствора СО гиперозида – зона адсорбции желтого или желто-зеленого цвета.

На хроматограмме испытуемого растворадолжны обнаруживаться три зоны флуоресценции желтого или желто-зеленого цвета – одна из них на уровне зоны рутина и две выше зоны рутина, зона зеленого цвета выше зоны рутина, допускается обнаружение других зон»

2. К 1 мл раствору (см. раздел «Количественное определение. Сумма флавоноидов» приготовление раствора А испытуемого раствора)

прибавляют 1 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и нагревают на водяной бане в течение 2 мин; должно наблюдаться красное окрашивание (лейкоантоцианы).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 13 %.

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

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 3 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 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 0,18 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

Другие части растения (стебли, черешки и листья). *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 10 %.

Осыпавшиеся прицветные чешуи. *Цельное сырье* – не более 25 %.

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:* сумма флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 0,3 %; эфирного масла – не менее 0,2 %.

Сумма флавоноидов

Приготовление растворов.

Раствор СО рутина. Около 0,05 г (точная навеска) СО рутина (рутина тригидрата), предварительно высушенного при температуре 130 – 135 °С в течение 3 ч, растворяют в 85 мл спирта 96 % в мерной 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 раствора не более 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

1,0 мл раствора А СО рутина, 2 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 % и 0,1 мл уксусной кислоты концентрированной, доведенного спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл (раствор Б СО рутина).

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 25 мл спирта 70 %, колбу взвешивают с погрешностью ± 0,01 г, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры и снова взвешивают, при необходимости доводят до первоначальной массы спиртом 70 % и фильтруют через бумажный складчатый фильтр (раствор А испытуемого раствора).

1,0 мл раствора А испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 % и 0,1 мл уксусной кислоты концентрированной, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора). Оптическую плотность раствор Б испытуемого раствора измеряют через 40 мин на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл раствора А испытуемого раствора и 0,1 мл уксусной кислоты концентрированной, доведенный спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО рутина. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл раствора А СО рутина, 0,1 мл уксусной кислоты концентрированной и доведенный спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) и вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 25 \cdot 25 \cdot P \cdot 100}{A_0 \cdot 100 \cdot 25 \cdot a \cdot 1 \cdot 100 \cdot (100 - W)} \cdot 100,$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
A_0 – оптическая плотность раствора Б СО рутина;
a – навеска сырья, г;
a_0 – навеска СО рутина, г;
P – содержание основного вещества в СО рутина, %;
W – влажность сырья, %.

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

$$X = \frac{A \cdot 25 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{ см}}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;

$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при длине волны 410 нм, равный 260;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Определение содержания эфирного масла проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1 или 2, из 30,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм, время перегонки - 3,5 ч).

Примечания

1. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин определяют в сырье, предназначенном для получения водных, спиртовых, спирто-водных извлечений, экстрактов.
2. Содержание эфирного масла определяют в сырье, предназначенном для получения эфирного масла.

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».

Федеральная электронная медицинская библиотека

Чабреца трава	**ФС.2.5.0047.15**
Thymi serpylli herba	**Взамен ГФ XI, вып. 2, ст. 60**
	(изм. № 1 от 16.06.1999)

Собранная в фазу цветения, высушенная и обмолоченная трава дикорастущего полукустарника тимьяна ползучего (чабреца) – *Thymus serpyllum* L., сем. яснотковых – *Lamiaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное (обмолоченное) сырье.* Смесь цельных или частично измельченных тонких стеблей, листьев и цветков. Стебли четырехгранные, тонкие, зеленовато- или желто-коричневого цвета, иногда с фиолетовым оттенком. Листья короткочерешковые, ланцетные, эллиптические или продолговато-эллиптические, длиной до 15 мм, голые или слабоопушенные с резко выступающими жилками на нижней стороне листа. При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) по всей поверхности листа видны многочисленные желтовато-коричневые точки (эфирномасличные железки), у основания листьев часто видны длинные щетинистые волоски.

Цветки мелкие, одиночные или собранные по нескольку штук в полумутовки. Каждый цветок состоит из двугубой чашечки и двугубого венчика. Чашечка длиной около 4 мм, венчик длиной 5 - 8 мм, тычинок – 4, пестик с четырехраздельной верхней завязью.

Цвет листьев – зеленый или серовато-зеленый; чашечки – красновато-коричневый; венчика – синевато-фиолетовый. Запах ароматный. Вкус водного извлечения горьковато-пряный.

Федеральный электронный медицинский библиотека

Измельченное сырье. Смесь кусочков тонких стеблей, листьев и цветков, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки стеблей четырехгранные, тонкие, зеленовато- или желтовато-коричневого цвета, иногда с фиолетовым оттенком; листья зеленые или серовато-зеленые, цельные и в виде кусочков различной формы; на поверхности листьев видны желтовато-коричневые точки (эфирномасличные железки), у основания листьев часто видны крупные щетинистые волоски или их обломки; цветки мелкие, одиночные с двугубым венчиком синевато-фиолетового цвета (венчик иногда обесцвечивается) и двугубой красновато-коричневой чашечкой, часто измельчены.

Цвет зеленый, серовато-зеленый или зеленовато-коричневый с зеленовато-фиолетовыми, желтовато-коричневыми, коричневато-белыми, бледно-фиолетовыми, коричневато-фиолетовыми, синевато-фиолетовыми, красновато-коричневыми вкраплениями. Запах ароматный. Вкус водного извлечения горьковато-пряный.

Порошок. Смесь кусочков стеблей, листьев, цветков, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки четырехгранных тонких стеблей голых или слегка опушенных, чаще в продольном сечении, желтовато-белые на изломе, снаружи – зеленовато-коричневые, красновато-коричневые или светло-коричневые, часто с фиолетовым оттенком; кусочки слабоопушенных листьев с многочисленными желтовато-коричневыми точками (эфирномасличные железки) светло-зеленого или зеленого цвета; на некоторых кусочках (по краю и у основания листа) видны редкие длинные щетинистые волоски; кусочки соцветий (чашечки или их части, опушенные с внешней стороны и по краю зубцов реснитчатыми волосками, иногда с заметными желтовато-коричневыми точками железок; лепестки венчика или

их части, опушенные с внешней стороны) зеленого, коричневато-зеленого, красно-коричневого, розовато-фиолетового или синевато-фиолетового цвета.

Цвет порошка серовато-зеленый или коричневато-зеленый с желтовато-белыми, красно-коричневыми, светло-коричневыми, часто с фиолетовым оттенком, синевато-фиолетовыми, розово-фиолетовыми, зелеными и темно-зелеными вкраплениями. Запах ароматный. Вкус водного извлечения горьковато-пряный.

Микроскопические признаки. *Цельное (обмолоченное), измельченное сырье.* При рассмотрении листа с поверхности должно быть видно, что клетки верхнего и нижнего эпидермиса с извилистыми боковыми стенками; на верхнем эпидермисе и по краю листа иногда заметна складчатость кутикулы и четковидное утолщение клеточных стенок. Устьица имеются на обеих сторонах листовой пластинки, на нижней стороне их значительно больше; устьица сопровождаются двумя околоустьичными клетками, смежные клетки которых расположены перпендикулярно устьичной щели (диацитный тип). Эфирномасличные железки крупные, состоят из 8 выделительных клеток, расположенных радиально; клетки эпидермиса вокруг места прикрепления железки часто образуют розетку. Волоски нескольких типов: очень крупные, многоклеточные, бородавчатые, расположенные у основания листа; выше по краю листовой пластинки встречаются более мелкие простые двух-, трехклеточные волоски с бородавчатой поверхностью; головчатые волоски очень мелкие с овальной одноклеточной головкой на короткой одноклеточной ножке, встречаются по всей поверхности листа; сосочковидные выросты эпидермиса, гладкие или слегка бородавчатые, чаще встречаются на верхней стороне и по краю листовой пластинки.

Клетки эпидермиса стебля прямоугольные, удлиненные, с прямыми или со скошенными концами, с четковидным утолщением клеточных стенок; устьица расположены в основном по ребрам. Эпидермис опушен простыми, коленчатоизогнутыми двух-, пятиклеточными волосками с бородавчатой

кутикулой, головчатыми волосками с овальной одноклеточной головкой на короткой одноклеточной ножке, реже встречаются сосочковидные выросты эпидермиса с гладкой или слегка бородавчатой кутикулой; встречаются эфирномасличные железки, состоящие из 8 выделительных клеток, расположенных радиально. На эпидермисе черешка располагаются сосочковидные выросты с гладкой или слегка бородавчатой кутикулой и многоклеточные волоски с бородавчатой кутикулой Клетки наружного и внутреннего эпидермиса листочков чашечки сильно извилистостенные; имеются волоски трех типов: простые, двух-, пятиклеточные с бородавчатой кутикулой, сосочковидные выросты эпидермиса с гладкой или слегка бородавчатой кутикулой, головчатые волоски с овальной одноклеточной головкой на короткой одноклеточной ножке.

Эпидермис трубки венчика прямостенный, с продольной складчатостью кутикулы с прямыми или со скошенными концами. В зеве и на отгибе венчика эпидермис извилистостенный, с сосочковидными выростами, опушен простыми и головчатыми волосками. Простые волоски двух-, четырех-, реже пятиклеточные с бородавчатой кутикулой. Головчатые волоски двух типов с овальной одноклеточной головкой на короткой одноклеточной ножке и с овальной одноклеточной головкой на двухклеточной ножке. На эпидермисе листочков чашечки и венчика встречаются крупные эфирномасличные железки, иногда с желто-коричневым содержимым, состоящие из 8 выделительных клеток, расположенных радиально; клетки эпидермиса вокруг места прикрепления железки иногда образуют розетку.

Порошок. При рассмотрении микропрепарата порошка должны быть видны клетки эпидермиса с извилистыми и утолщенными боковыми стенками; устьица с 2 околоустьичными клетками, смежные стенки которых расположены перпендикулярно устьичной щели (диацитный тип). Округлые эфирномасличные железки состоят из 8 выделительных клеток, расположенных радиально, клетки эпидермиса вокруг места прикрепления

часто образуют розетку. Простые волоски 3 типов: очень крупные многоклеточные бородавчатые волоски или их фрагменты; более мелкие 2-, 3-клеточные волоски с бородавчатой поверхностью, часто слегка согнутые в местах сочленения; сосочковидные выросты эпидермиса с гладкой или слегка бородавчатой поверхностью; головчатые волоски с овальной одноклеточной головкой на короткой одноклеточной ножке. На фрагментах стеблей и частях цветков видны точно такие же трихомы, как и на листьях, за исключением бородавчатых волосков: на цветках многоклеточные простые волоски имеют более тонкие оболочки и покрыты нежно-бородавчатой кутикулой; головчатые волоски 2 типов: на одноклеточной ножке с одноклеточной головкой и на 2-клеточной ножке с одноклеточной головкой.

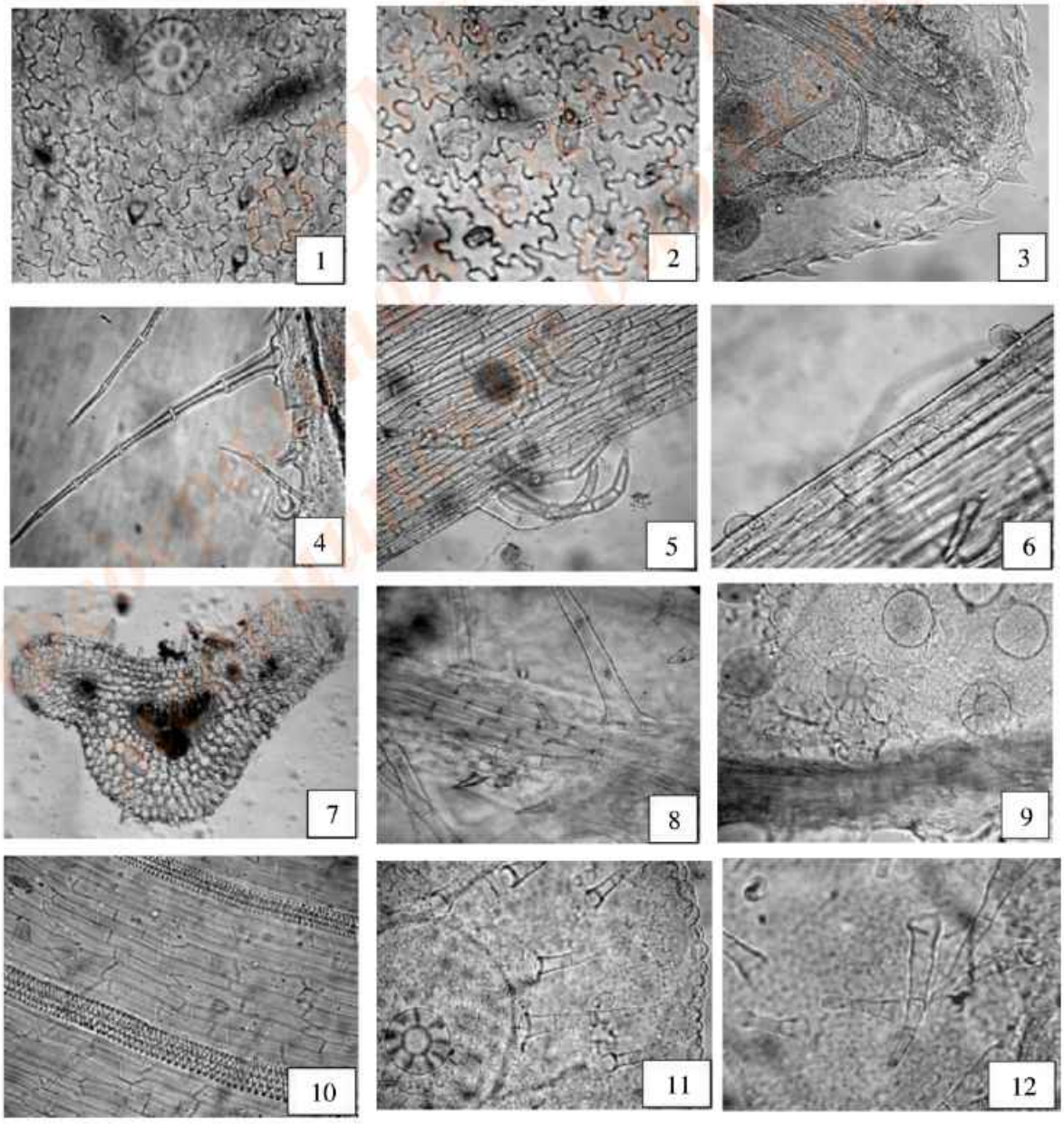


Рисунок – Чабреца трава.

1 – фрагмент верхнего эпидермиса листа с эфирномасличными железками (вид сверху), с сосочковидными выростами (300×), 2 – фрагмент нижнего эпидермиса листа с головчатым волоском, устьица диацитного типа (300×), 3 – фрагмент края листа с эфирномасличными железками (вид сверху), с сосочковидными выростами (300×), 4 – фрагмент края листа с многоклеточными бородавчатыми и 3-клеточными волосками (300×), 5 – фрагмент эпидермиса по стеблю с эфирномасличными железками (вид сверху), многоклеточными простыми волосками (300×), 6 – фрагмент эпидермиса по стеблю с головчатыми волосками (300×), 7 – поперечный срез черешка листа (120×), 8 – фрагмент эпидермиса чашечки с многоклеточными простыми и головчатыми волосками, с сосочковидными выростами (300×), 9 – фрагмент эпидермиса чашечки с эфирномасличными железками (вид сверху) (300×), 10 – фрагмент эпидермиса трубки венчика (300×), 11 – фрагмент эпидермиса отгиба венчика с сосочковидными выростами, головчатыми и простыми многоклеточными волосками, эфирномасличными железками (вид сверху) (300×), 12 – фрагмент эпидермиса венчика с простыми многоклеточными и головчатыми волосками на 2-клеточной ножке (300×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Раствор стандартного образца (СО) лютеолин-7-О-глюкозида. Около 0,1 г СО лютеолин-7-О-глюкозида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют в 85 мл спирта 70 % и нагревают на водяной бане до полного растворения. Затем охлаждают, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают. Срок годности раствора 3 мес.

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором на алюминиевой подложке размером 10 × 15 см наносят 20 мкл испытуемого раствора (см. раздел «Количественное определение. Сумма флавоноидов» приготовление раствора А), рядом – 5 мкл раствора СО лютеолин-7-О-глюкозида. Пластинку с нанесенными пробами сушат, помещают в камеру со смесью растворителей (без предварительного насыщения) этилацетат – муравьиная кислота безводная – вода (70:15:15) 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 алюминия хлорида раствором 2 %, сушат и сразу просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме СО лютеолин-7-О-глюкозида должна обнаруживаться желтая зона.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией желтого цвета на уровне зоны адсорбции СО лютеолин-7-О-глюкозида и 3 зоны адсорбции желтого цвета ниже; допускается обнаружение других зон адсорбции (флавоноиды).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное (обмолоченное) сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 13 %.

Зола общая. *Цельное (обмолоченное) сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 12 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное (обмолоченное) сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 5 %.

Измельченность сырья. *Цельное (обмолоченное) 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 0,18 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

Кусочки стеблей толщиной более 0,5 см. *Цельное (обмолоченное) сырье, измельченное сырье* – не более 10 %.

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

Минеральная примесь. *Цельное (обмолоченное) сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 1 %.

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 (обмолоченное) сырье, измельченное сырье, порошок:* суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-О-глюкозид – не менее 0,9 %; экстрактивных веществ, извлекаемых водой, – не менее 18 %; экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 30 %, – не менее 18 %.

Сумма флавоноидов

Алюминия хлорида раствора 5 % в спирте 70 %. 5,0 г алюминия хлорида растворяют в 40 мл спирта 70 % в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают. Срок годности раствора 3 мес.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл спирта 70 % и взвешивают с погрешностью ± 0,01 г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на

кипящей водяной бане в течение 60 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Затем колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и при необходимости доводят до первоначальной массы спиртом 70 %. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр, смоченный тем же спиртом, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А).

2,5 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл алюминия хлорида раствора 5 % в спирте 70 % и через 10 мин – 1 мл уксусной кислоты раствора 3 %, доводят объем раствора тем же спиртом до метки, перемешивают и оставляют на 30 мин (раствор Б).

Оптическую плотность раствора Б измеряют через 30 мин на спектрофотометре при длине волны 396 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения раствор, состоящий из 2,5 мл раствора А, 1 мл уксусной кислоты раствора 3 %, доведенный спиртом 70 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-О-глюкозид в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\,см}^{1\%} \cdot a \cdot 2{,}5 \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б;

$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения лютеолин-7-О-глюкозид с алюминия хлоридом в спирте 70 % при длине волны 396 нм, равный 345;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Определение экстрактивных веществ, извлекаемых водой, проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (навеска сырья – 1,0 г, экстрагент – вода очищенная.

Определение экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 30 %, проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1, навеска сырья – 1,0 г, экстрагент – спирт 30 %).

Примечание. Определение суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-О-глюкозид проводят в сырье, предназначенном для производства лекарственных растительных препаратов (пачки, фильтр-пакеты); экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 30 % и водой, – в сырье, предназначенном для производства экстрактов.

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».

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Череды трехраздельной трава	**ФС.2.5.0048.15**
Bidentis tripartitae herba	**Взамен ГФ XI, вып. 2, ст. 45**

Собранная в фазы бутонизации и начала цветения и высушенная трава дикорастущего и культивируемого однолетнего травянистого растения череды трехраздельной – *Bidens tripartita* L., сем. астровых – *Asteraceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Цельные и частично измельченные олиственные стебли, листья и цветочные корзинки. Листья супротивные, на коротких, сросшихся основаниями черешках, срединные 3-, 5-раздельные, с ланцетовидными пальчатыми долями, верхушечные цельные, широколанцетные, длиной до 15 см, край неровно- и крупнозубчатый. Стебли округлоовальные, продольно-бороздчатые, толщиной до 0,8 см. Соцветия – корзинки диаметром 0,6 – 1,5 см. Наружные листочки обвертки в количестве 3 – 8, зеленые, удлиненно-ланцетовидные, коротко-заостренные, к основанию суженные, по краям шиповидно-реснитчатые, равные или в 2 раза превышающие по размеру корзинку. Внутренние листочки обвертки более короткие, удлиненно-овальные, по краю пленчатые, коричневато-желтые. Цветки мелкие, трубчатые. Семянки обратно-продолговато-яйцевидные, имеют 2 ости, наполовину короче семянок. Цвет листьев зеленый или коричневато-зеленый, стеблей – зеленый или зеленовато-фиолетовый, цветков – грязновато-желтый.

При рассматривании листьев под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видно, что верхняя сторона листа гладкая, а нижняя покрыта редкими волосками, край листа шиповатый (шипики до 1 мм). Стебель

мелкобороздчатый, покрыт редкими волосками. Внутренние листочки обвертки с широкой светло-желтой пленчатой каймой, центральная часть полосатая: черные полоски чередуются с желтыми. Прицветники сходны с ними, но более узкие и с широким перепончатым краем, по размеру равные цветкам, а при плодах – семянкам. Цветки трубчатые, желтые. Семянки и ости семянок покрыты вниз отстоящими щетинками. Между остями находятся остатки цветка. Запах слабый. Вкус водного извлечения горьковатый, слегка вяжущий.

Измельченное сырье. Смесь кусочков листьев, стеблей, бутонов, цветков и семянок, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет зеленый, коричневато-зеленый или зеленовато-фиолетовый с желтыми и белыми вкраплениями. Запах слабый. Вкус водного извлечения горьковатый, слегка вяжущий.

Порошок. Смесь кусочков листьев, стеблей, бутонов, цветков и семянок различной формы, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Цвет желтовато-серый с зелеными, коричневато-зелеными, зеленовато-фиолетовыми, желтыми и белыми вкраплениями. Запах слабый. Вкус водного извлечения горьковатый, слегка вяжущий.

Примечание. К другим видам череды, встречающимся в сырье как примесь, относятся:

1. *Череда лучистая (Bidens radiata Thuill.)*, имеет супротивные листья, желтовато-зеленые, на черешках, чаще 3-раздельные, реже цельные или 5-раздельные, с ланцетными или яйцевидно-ромбическими долями, конечная доля значительно крупнее боковых. При рассматривании под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны мелкобороздчатые, в верхней части редковолосистые, в нижней части – голые стебли. Верхняя и нижняя стороны листьев покрыты редкими крупными волосками, край листьев шиповато-пильчатый (шипики до 1 мм). Цветочные корзинки 12 – 15мм, ширина их больше высоты. Цветки трубчатые обоеполые. Наружные листочки обвертки в числе 9 – 14, линейно-продолговатые или почти ланцетовидные, гладкие, по краям шиповидно-реснитчатые, превышающие иногда в 3 раза высоту корзинки; внутренние листочки – продолговатые, короче цветков с широкой желтой пленчатой каймой и хорошо заметными темными полосками млечников. Прицветники сходны с ними, но более узкие и с широким перепончатым краем, превышающие длину семянок. Семянки обратноклиновидные, с 2, реже 3 остями, которые немного короче или равны

им, по краю обычно волнисто-бугорчатые с вниз направленными щетинками на ребрах и остях.

2. *Череда поникшая* (*Bidens cernua* L.), имеет супротивно расположенные листья, цельные, сидячие, ланцетные, на верхушке длиннозаостренные. При рассматривании под лупой (10×) или в стереомикроскоп (16×) видны мелкобороздчатые, покрытые редкими волосками стебли. Верхняя и нижняя сторона листьев гладкая, светло-зеленая, край листа пиловидно-зубчатый. Цветочные корзинки 10 – 15мм, ширина их больше высоты. Цветки трубчатые, обоеполые. Встречаются краевые язычковые – бесполые. Наружные листочки обвертки в числе 5 – 9, линейно-продолговатые, гладкие, по краям шиповидно-ресничатые; внутренние продолговато-яйцевидные, почти равные цветкам с широкой желтой пленчатой каймой и хорошо заметными темными полосками млечников. Прицветники сходны с ними, но более узкие и с широким перепончатым краем, по размеру равные цветкам. Семянки обратноклиновидные, обычно с 2 остями, которые наполовину короче семянок. Между остями находятся остатки цветка. Ости и ребра семянки покрыты вниз отстоящими щетинками.

Микроскопические признаки. *Цельное и измельченное сырье.* При рассмотрении с поверхности эпидермиса листа должно быть видно, что клетки обеих сторон листовой пластинки извилистостенные. Устьица аномоцитного типа, на нижней стороне листовой пластинки устьиц больше (лист амфистоматический). По всей листовой пластинке встречаются волоски 2 типов. Первые – это гусеницеобразные волоски, состоящие из 9 – 18 клеток, с тонкими стенками. У основания волоска лежит крупная клетка вытянутой формы. Второй тип представлен простыми волосками с толстыми стенками, состоящими из 2 – 13 клеток с заостренной конечной клеткой. Они чаще встречается на нижней стороне листовой пластинки и по крупным жилкам. Иногда эти волоски могут быть заполнены коричневым содержимым. В мезофилле листа вдоль жилок расположены секреторные ходы с коричневым или красновато-коричневым содержимым.

При рассмотрении с поверхности эпидермиса наружных (больших) и внутренних (маленьких) листочков обвертки отчетливо должны быть видны извилистостенные клетки, как с верхней, так и с нижней стороны листочков обвертки. С нижней стороны листочков, вдоль жилок, клетки эпидермиса

более вытянутые. Устьица овальные, встречаются на нижней и верхней стороне листков обвертки, окружены 3 – 5 околоустьичными клетками (аномоцитный тип), с узкой устьичной щелью (амфистоматический лист). По всей поверхности и краю листочков встречаются волоски 2 типов: первые – это многоклеточные (6 – 12 клеток) гусеницеобразные, длинные с тонкими стенками, прилегают к поверхности листочка обвертки; вторые – многоклеточные (2 – 4 клеток) простые волоски с толстыми стенками. Оба вида волосков имеют сильно утолщенное многоклеточное основание. Второй тип волосков встречается гораздо чаще, чем первый. Также в мезофилле листочков вдоль жилок находятся секреторные ходы с коричневым или красновато-коричневым содержимым.

При рассмотрении лепестков венчика трубчатых цветков с поверхности должны быть видны слегка извилистые стенки клеток эпидермиса. Пыльца округло-многогранной формы. Поверхность пыльцы – шиповатая, без апертур.

Строение стебля и черешка одинаковое (диаметр черешка меньше диаметра стебля). На кусочках поперечного сечения стебля и черешка видно, что оба имеют пучковый тип строения.

Порошок. При рассмотрении препаратов порошка должны быть видны кусочки (в продольном сечении) стеблей, черешков, семянок; фрагменты листьев, прицветных листьев, листочков обвертки и цветков.

Фрагменты клеток эпидермиса с извилистыми стенками и аномоцитными устьицами. Встречаются остатки гусеницеобразных и толстостенных волосков с крупной клеткой вытянутой формы у основания, иногда с коричневым содержимым внутри; фрагменты эпидермиса с секреторными ходами, заполненными коричневым содержимым. Должны быть видны фрагменты пленчатого прицветного листа со слегка извилистыми и четковидно-утолщенными клеточными стенками (простые поры). Встречаются остатки стебля и черешка. Видны кусочки эпидермиса лепестков венчика трубчатых цветков со спиральными сосудами и

вкраплениями шиповатой пыльцы округло-многогранной формы. Встречаются кусочки семянок и их остей с остатками одноклеточных, толстостенных волосков.

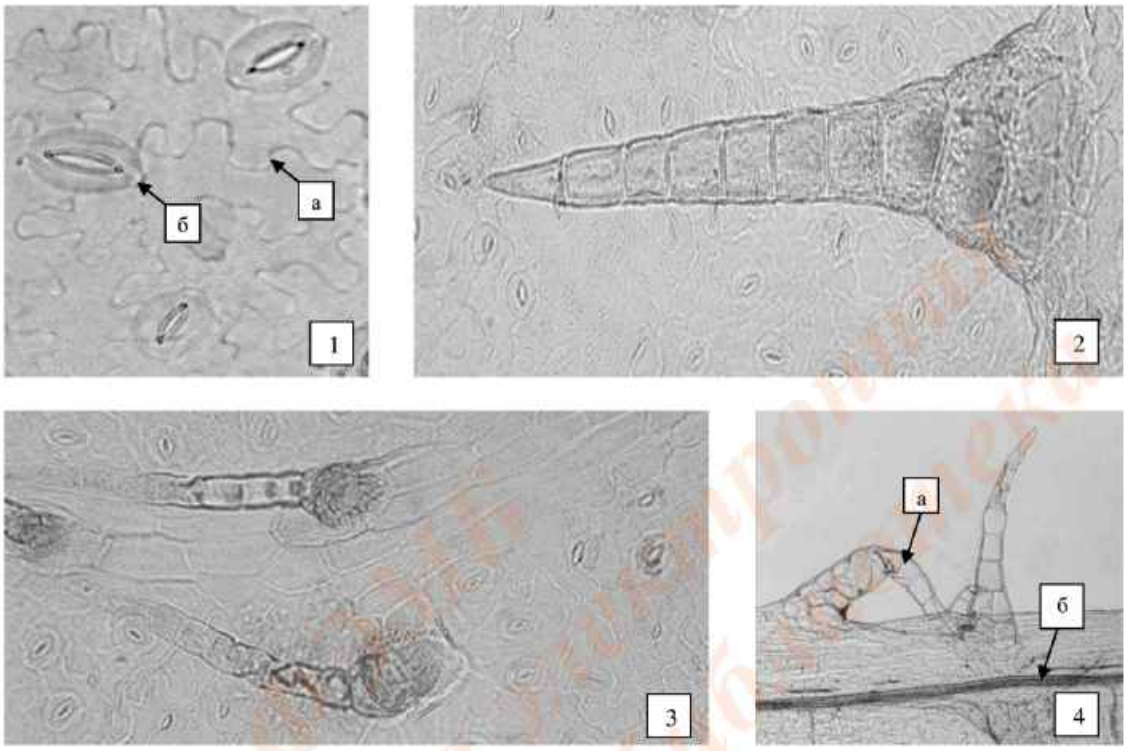


Рисунок – Череды трехраздельной трава.
1 – фрагмент эпидермиса: а – извилистые стенки эпидермиса, б – устьица аномоцитного типа (400×); 2 – толстостенный волосок (200×); 3 – гусеницеобразные волоски (200×); 4 – фрагмент черешка: а – многоклеточные толстостенные волоски, б – секреторный ход вдоль жилки (40×)

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов

Раствора стандартного образца (СО) рутина. Около 0,005 г рутина (рутина тригидрата) растворяют в 10 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствора СО кверцетина. Около 0,005 г кверцетинадигидрата или кверцетина растворяют в 10 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Дифенилборилоксиэтиламина раствора 1 % в спирте 96 %. 1,0 г дифенилборилоксиэтиламина (дифенилборной кислоты аминоэтилового

эфира) растворяют в 100 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Полиэтиленгликоля (ПЭГ) раствора 5 % в спирте 96 %. 5,0 мл полиэтиленгликоля (ПЭГ) 400 смешивают со 100 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 6 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

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

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля на алюминиевой подложке размером 10 × 10 см в виде полос длиной 10 мм, шириной не более 3 мм наносят 30 мкл испытуемого раствора и параллельно в одну полосу по 5 мкл растворов СО рутина и кверцетина. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре в течение 5 мин, помещают в камеру, выложенную изнутри фильтровальной бумагой, предварительно насыщенную в течение не менее 30 мин, смесью растворителей этилацетат - муравьиная кислота безводная - вода (40:4:6) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры и сушат до удаления следов растворителей. Далее пластинку нагревают в сушильном шкафу 2-3 мин при 100-105 °С и еще теплую обрабатывают последовательно дифенилборилоксиэтиламина раствором в 1 % спирте 96 % и полиэтиленгликоля раствором 5 % в спирте 96 %. Через 30 мин после обработки пластинку просматривают при дневном свете.

На хроматограмме растворов СО рутина и СО кверцетина должны обнаруживаться: зона желтого, желто-оранжевого или оранжевого цвета по

рутину, и над ней зона желтого, желто-оранжевого или оранжевого цвета по кверцетину.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться: две зоны красного или фиолетово-красного цвета между зонами рутина и кверцетина; зона желтого цвета между вышеуказанными зонами красного или фиолетово-красного цвета; зона желтого или розово-желтого цвета на уровне зоны кверцетина; допускается обнаружение дополнительных зон красного или фиолетово-красного цвета выше указанных. Не допускается обнаружение ярко-выраженной зоны желтого цвета, расположенной над верхней обязательной зоной красного или фиолетово-красного цвета (трава череды поникшей) Хроматограмму просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме растворов СО рутина и СО кверцетина должны обнаруживаться: зона желтого, желто-оранжевого или оранжевого цвета (рутин), и над ней зона желтого, желто-оранжевого или оранжевого цвета (кверцетин).

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться следующие зоны фенольных соединений: две зоны с красно-коричневой флуоресценцией или нефлуоресцирующие (темные) между зонами рутина и кверцетина; две зоны с оранжево-желтой или розово-желтой флуоресценцией ниже зоны кверцетина и на уровне зоны кверцетина; две зоны с голубой флуоресценцией между зонами с оранжево-желтой или розово-желтой флуоресценцией; не допускается обнаружение ярко-выраженной зоны с оранжево-желтой флуоресценцией, расположенной над верхней зоной с красно-коричневой флуоресценцией или нефлуоресцирующей (темной) (трава череды поникшей); допускается обнаружение дополнительных зон.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 13 %.

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

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 7 %.

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 7 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 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

Изменившие окраску части растения (потемневшие и почерневшие). *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 8 %.

Стебли, в том числе отделенные при анализе. *Цельное сырье* – не более 40 %.

Кусочки стеблей. *Измельченное сырье* – не более 40 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3 %.

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

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».

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

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

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок:* сумма флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 0,5 %; сумма полисахаридов – не менее 3,5 %.

Сумма флавоноидов

Аналитическую пробу травы измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченной травы помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл спирта 70 %, колбу взвешивают с погрешностью ± 0,01 г, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 1 часа. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры и взвешивают, при необходимости доводят до первоначальной массы спиртом 96 %. Содержимое колбы фильтруют через бумажный складчатый фильтр, отбрасывая первые 25 мл фильтрата (раствор А).

1,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 % и доводят раствор до метки спиртом 96 % (раствор Б). Через 40 минут измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 415 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл раствора А и 0,1 мл уксусной кислоты концентрированной, доведенный спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 25 \cdot 50 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)},$$

где A - оптическая плотность раствора Б;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при длине волны 415 нм, равный 260;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Полисахариды

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм. Около 10 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл воды, колбу присоединяют к обратному холодильнику и кипятят ее содержимое при перемешивании на электрической плитке в течение 30 мин. Экстракцию водой повторяют еще 4 раза по 100 мл в течение 30 мин каждый раз. Водные извлечения центрифугируют с частотой вращения 5000 об/мин в течение 10 мин и декантируют в мерную колбу вместимостью 500 мл через 5 слоев марли, вложенной в стеклянную воронку диаметром 66 мм и предварительно смоченной водой. Фильтр промывают водой и доводят объем раствора водой до метки (раствор А).

25,0 мл раствора А помещают в центрифужную пробирку, прибавляют 75 мл спирта 96 %, перемешивают, подогревают на водяной бане при температуре 60 °С в течение 5 мин. Через 30 мин содержимое центрифугируют со скоростью вращения 5000 об/мин в течение 30 мин.

Надосадочную жидкость фильтруют под вакуумом при остаточном давлении 13 – 16 кПа через высушенный до постоянной массы при температуре 100 – 105 °С стеклянный фильтр ПОР 16 диаметром 40 мм. Затем осадок количественно переносят на тот же фильтр и промывают 15 мл смеси спирта 96 % и воды (3:1). Фильтр с осадком сушат сначала на воздухе, затем при температуре 100 - 105 °С до постоянной массы.

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

$$X = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 500 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot 25 \cdot (100 - W)},$$

где m_1 – масса фильтра, г;
m_2 – масса фильтра с осадком, г;
a – навеска сырья, г;
W – влажность сырья, %.

Примечание

Определение полисахаридов и флавоноидов проводят для сырья, предназначенного для производства лекарственных растительных препаратов (пачки, фильтр-пакеты).

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».

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Черёмухи обыкновенной плоды	**ФС.2.5.0049.15**
Padi avii fructus	**Взамен ГФ XI, вып. 2, ст. 36**

Собранные в период полного созревания и высушенные плоды многолетнего дикорастущего и культивируемого растения черёмухи обыкновенной – *Padus avium Mill.*, сем. розоцветных – *Rosaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Плоды – костянки шарообразной или продолговато-яйцевидной формы, иногда к верхушке несколько заостренные, диаметром до 8 мм, морщинистые, без плодоножек, с округлым белым рубцом на месте отпадания плодоножки. Внутри плода содержится одна округлая или округлояйцевидная, очень плотная, светло-бурая косточка диаметром до 7 мм с одним семенем. Поверхность плодов морщинистая, косточки – поперечно-ребристая.

Цвет плодов черный, матовый, реже блестящий, иногда с беловато-серым или красноватым налетом на складках. Запах слабый. Вкус сладковатый, слегка вяжущий. Вкус водного извлечения вяжущий.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* Эпидермис состоит из многоугольных прямостенных клеток. Кутикула прозрачная, хорошо отделяется от паренхимы. Устьица овальные, встречаются по всей поверхности плода, окружены 7 – 8 клетками эпидермиса (аномоцитный тип). Характерным диагностическим признаком является наличие скоплений клеток, заполненных бурым содержимым (цвет обусловлен накоплением антоцианов), окружающих устьичный аппарат. Клетки паренхимы тонкостенные, многоугольные, заполнены красным содержимым, плотно

прилегают друг к другу.

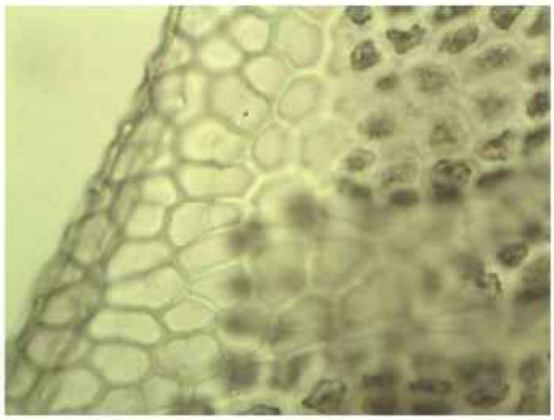


Рисунок 1 – Черемухи обыкновенной плоды (400×). Эпидермис с многоугольными клетками с прямыми стенками.

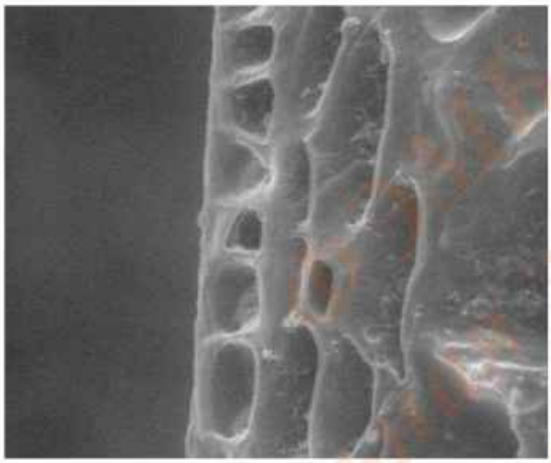


Рисунок 2 – Черемухи обыкновенной плоды. Клетки эпидермиса (вид сбоку) (500×).

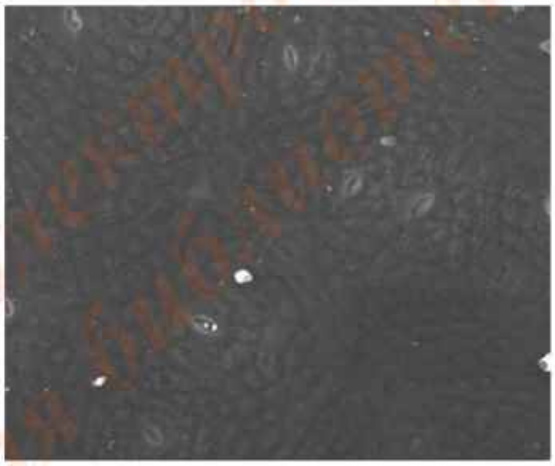
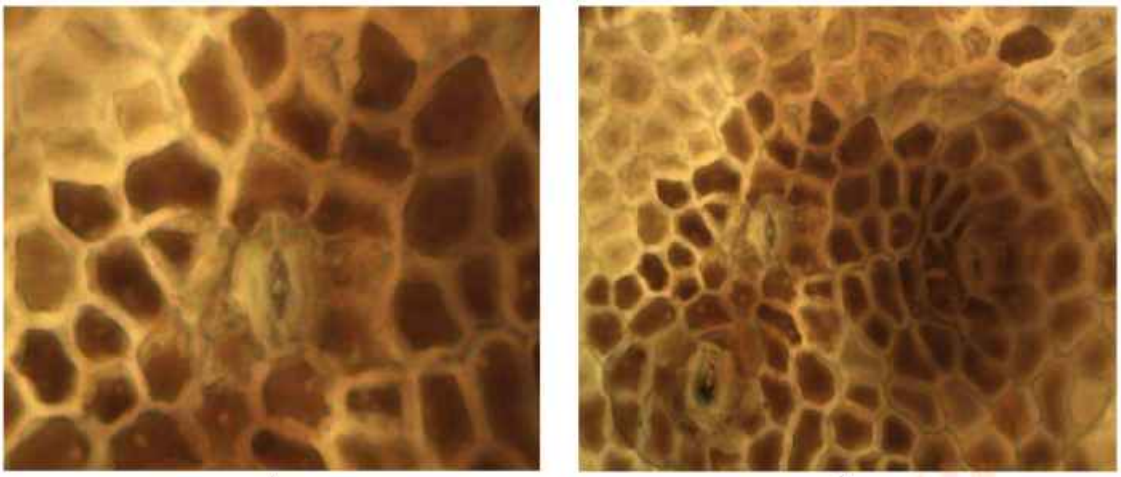


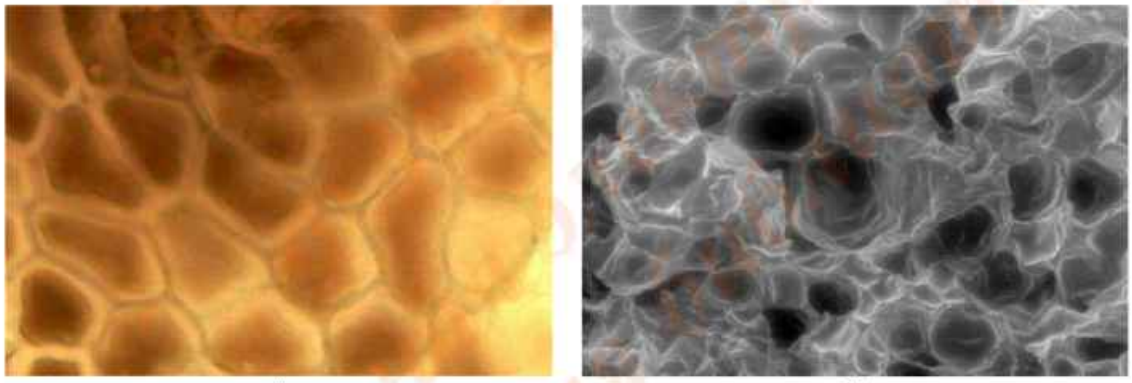
Рисунок 3 – Черемухи обыкновенной плоды. Устьица аномоцитного типа (500×).

Федеральная электронная медицинская библиотека



А Б

Рисунок 4 – Черемухи обыкновенной плоды. Скопление клеток, окружающих устьицы и заполненных бурым содержимым (А: 1000×; Б: 800×).



А Б

Рисунок 5 – Черемухи обыкновенной плоды. Клетки паренхимы тонкостенные, многоугольные, плотно прилегающие друг к другу (А: 500×, Б: 1000×).

Определение основных групп биологически активных веществ

*1. **Тонкослойная хроматография***

Железа(II) аммония сульфата раствор 1 %. 1,0 г железа(II) аммония сульфата растворяют в воде очищенной и доводят тем же растворителем до 100 мл.

Около 2,0 г сырья, измельчённого до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, помещают в круглодонную колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл хлористоводородной кислоты раствора 1 % в спирте 96 % и нагревают с обратным холодильником

при температуре 50 °С на водяной бане в течение 60 мин. Полученное извлечение сливают. Раствор упаривают в вакууме до половины объёма (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором на алюминиевой подложке размером 10 × 15 см наносят 5 мкл полученного раствора. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 1 ч смесью растворителей этилацетат – уксусная кислота ледяная – муравьиная кислота безводная – вода (100:10:10:25), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдёт около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции красного цвета; допускается обнаружение других зон адсорбции красного цвета.

При проявлении хроматограммы парами аммиака зона адсорбции синеет.

2. Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм. Около 1,0 г измельчённого сырья помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл воды и нагревают на водяной бане в течение 30 мин, фильтруют через бумажный фильтр. К 2 мл водного извлечения прибавляют 1 мл железа(II) аммония сульфата раствора 1 % и перемешивают. Раствор при этом окрашивается в темно-зелёный цвет, а при стоянии выпадает темный, почти черный осадок (фенольные соединения).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье* – не более 14 %.

Зола общая. *Цельное сырье* – не более 5 %.

Федеральный электронный медицинский библиотека ФЭМБ

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье* – не более 1 %.

Посторонние примеси

Плоды, пригоревшие и поврежденные насекомыми. *Цельное сырье* – не более 3 %.

Плоды, недозрелые и потемневшие. *Цельное сырье* – не более 3 %.

Другие части черемухи (плодоножки, в том числе отделенные при анализе, и веточки). *Цельное сырье* – не более 3 %.

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

Минеральная примесь. *Цельное сырье* – 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:* дубильных веществ в пересчете на танин – не менее 1,7 %.

Определение дубильных веществ проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1).

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».

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Черники обыкновенной плоды **ФС.2.5.0050.15**

Vaccinii myrtilli fructus **Взамен ГФ XI, вып. 2, ст. 35**

Собранные зрелые и высушенные плоды дикорастущего и культивируемого многолетнего кустарника черники обыкновенной – *Vaccinium myrtillus* L., сем. вересковых – *Ericaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Плоды – ягоды диаметром 3 – 6 мм, бесформенные, сильно сморщенные, в размоченном виде шаровидные. На верхушке плодов виден остаток чашечки в виде небольшой кольцевой оторочки, окружающей вздутый диск с остатком столбика в центре или с небольшим углублением на месте его отпадания. В мякоти плода – многочисленные (до 30 штук) семена, коричневые, неясно-крупносетчатые, сжатые с боков и выпуклые по спинке. У основания плода иногда имеется короткая плодоножка.

Цвет плодов с поверхности – черный с красноватым оттенком, матовый или слегка блестящий; мякоти – красно-фиолетовый; семян – красно-коричневый. Запах слабый. Вкус водного извлечения кисловато-вяжущий.

Микроскопические признаки. Клетки эпидермиса плодов сгруппированы и разграничены между собой более толстыми клеточными стенками (окончатого типа).

Федеральная электронная медицинская библиотека

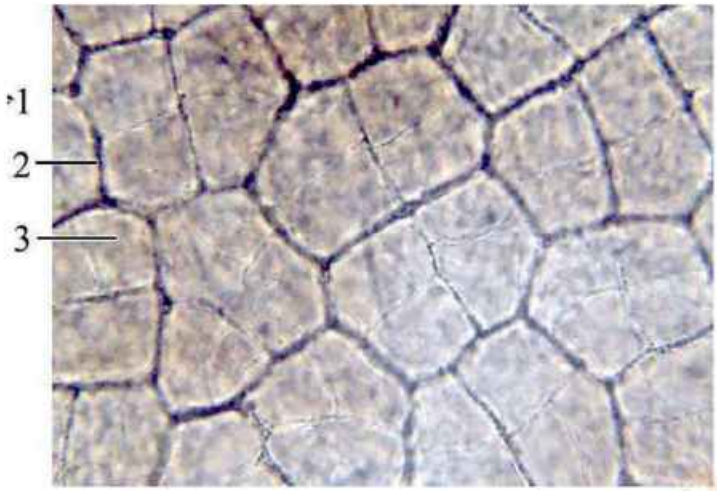


Рисунок 1 – Черника обыкновенная плоды.
Эпидермис плодов (100×) 1 – клетки эпидермиса; 2 – клеточная стенка; 3 – протопласт клеток эпидермиса.

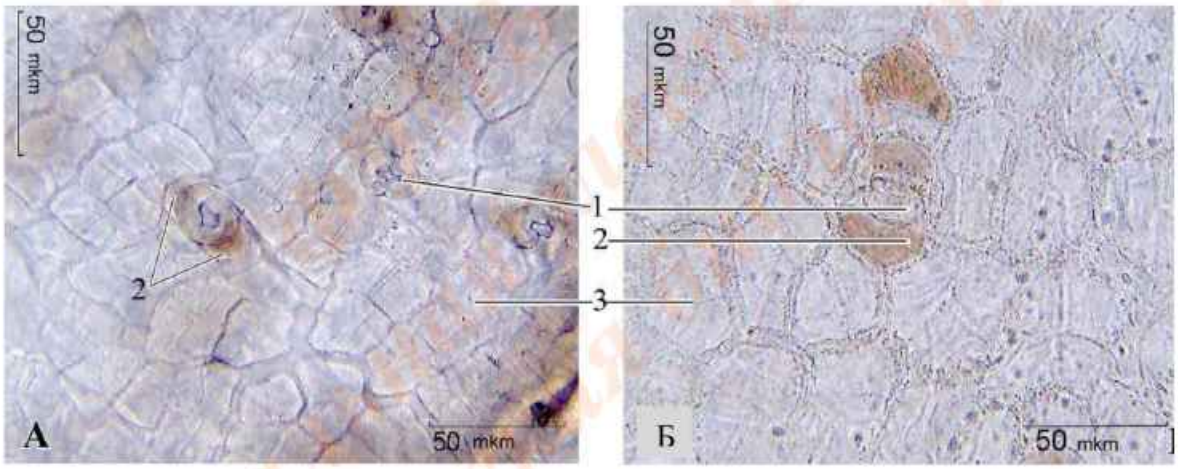


Рисунок 2 – Черника обыкновенная плоды.
Эпидермис плодов (400×).
А – Эпидермис диска; Б – Эпидермис остальной части плода.
1 – замыкающие клетки устьиц, 2 – околоустьичные клетки,
3 – клетки эпидермиса.

Эпидермальные клетки и 2 – 3 ряда подстилающих клеток вытянуты в тангентальном направлении. Наружная стенка эпидермальных клеток утолщена сильнее остальных. Кутикула тонкая, покрыта восковым слоем. 2 – 3 ряда субэпидермальных клеток имеют слабоколленхиматозный характер. К центру плода оболочки клеток становятся более тонкими.

Устьица на зрелом плоде встречаются редко, обычно они деформированы. Эпидермис диска отличается от остальной поверхности плода более мелкими клетками и наличием хорошо сохранившихся устьиц. Устьица окружены 4 – 5 околоустьичными клетками (аномоцитного типа).

Мезокарпий представлен рыхлой паренхимой, клетки которой окрашены антоцианами. Проводящие пучки очень тонкие, в основном представлены спиральными сосудами. Встречаются друзы оксалата кальция, которые преимущественно локализуются в эндокарпии.

Эндокарпий состоит из большого числа толстостенных, полигональных, пористых клеток (склереид).

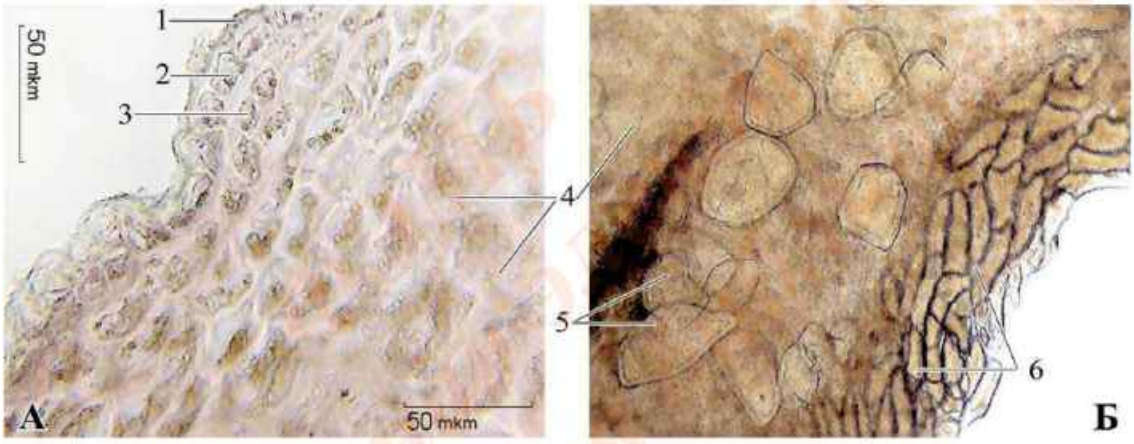


Рисунок 3 – Черника обыкновенная плоды.
Фрагменты перикарпия плодов черники (400×). Давленый препарат.
А – Фрагменты экзокарпия; Б – фрагменты эндокарпия. 1 – кутикула,
2 – клетки эпидермиса; 3 – колленхима, 4 – клетки мезокарпия,
5 – брахисклереиды мезокарпия, 6 – склереиды эндокарпия.

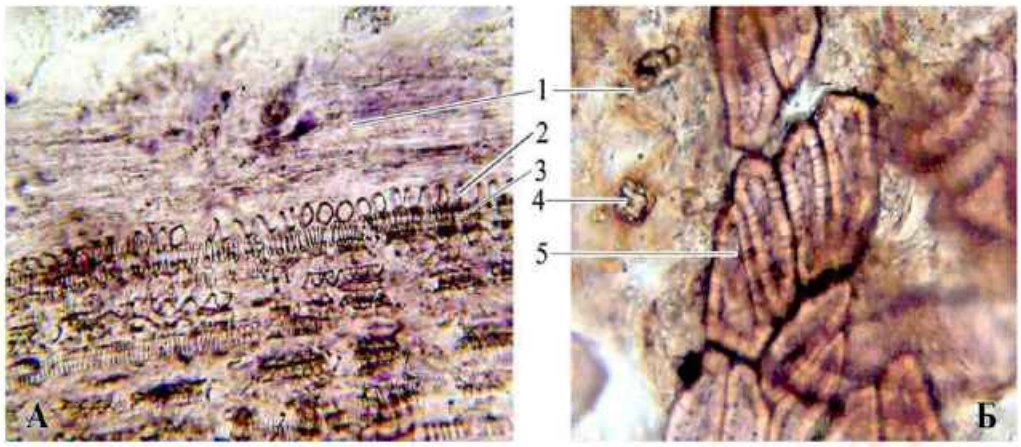


Рисунок 4 – Черника обыкновенная плоды.
Фрагменты перикарпия плодов черники (400×).
А – Мезокарпий плода. Сосудистые пучки. Б – Фрагмент эндокарпия.
1 – клетки паренхимы мезокарпия, 2 – кольчатые сосуды; 3 – спиральные сосуды, 4 – толстостенные клетки (склереиды); 5 – друзы оксалата кальция.

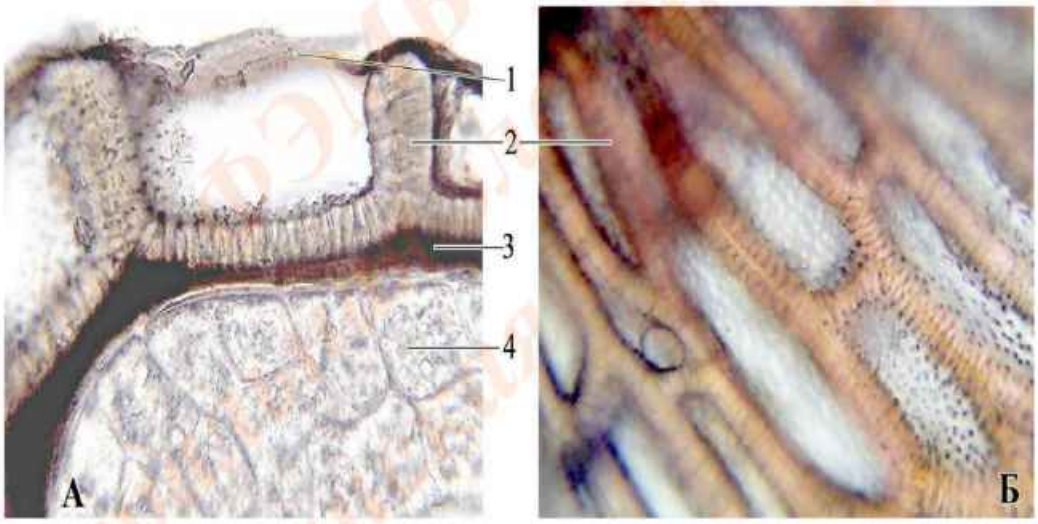


Рисунок 5 – Черника обыкновенная плоды.
Семенная кожура плодов черники (400×). А – Продольный срез;
Б – эпидермис с поверхности. 1 – ослизняющиеся стенки эпидермальных клеток семени; 2 – кожура семени; 3 – спавшаяся паренхима семенной кожуры; 4 – эндосперм.

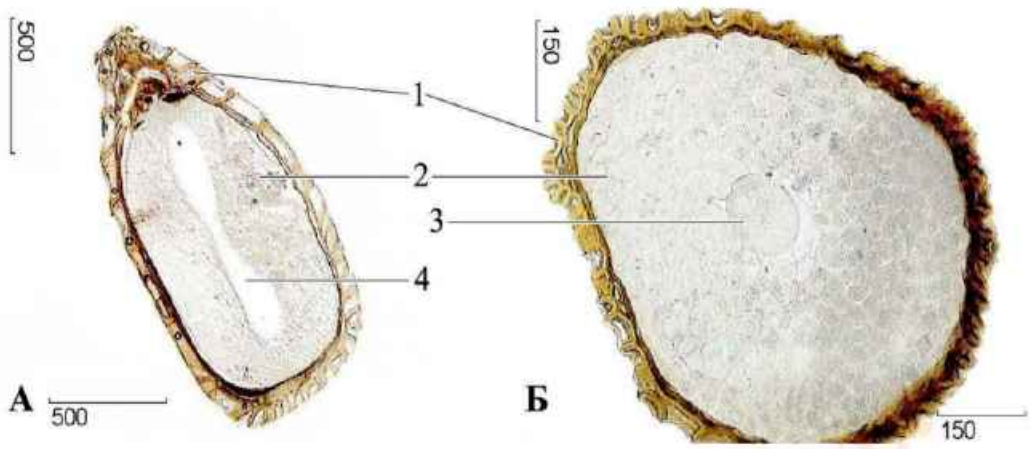


Рисунок 6 – Черника обыкновенная плоды.
Семя черники. Зародыш. **А** – Продольный срез (40×);
Б – поперечный срез (100×). 1 – семенная кожура, 2 – эндосперм,
3 – зародыш, 4 – место локализации зародыша (на продольном срезе семени).

Семена состоят из семенной кожуры, эндосперма, зародыша. Эпидермис семенной кожуры хорошо выражен, остальные клетки спадаются. Эпидермальные клетки вытянуты вдоль семени, внутренняя и боковая стенки склерефицированы, пронизаны порами. Ослизняется только наружная стенка эпидермальных клеток. Эндосперм мощный, зародыш небольшой. Клетки зародыша и эндосперма содержат алейроновые зерна и жирное масло.

Определение основных групп биологически активных веществ

1. *Тонкослойная хроматография*

Около 2,0 г плодов помещают в коническую колбу со шлифом, прибавляют 10 мл спирта 96 %, содержащего хлористоводородной кислоты раствора 1 %, закрывают пробкой и перемешивают в течение 30 мин. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором на алюминиевой подложке размером 10 × 15 см наносят 20 мкл испытуемого раствора. Пластинку с нанесенной пробой сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 5 ч смесью растворителей *н*-бутанол – уксусная кислота ледяная – вода (4:1:2), 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 просматривают при дневном свете.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться зона адсорбции фиолетового цвета и выше – зона адсорбции розового цвета; допускается обнаружение других зон адсорбции.

2. При прибавлении к отвару 2 капель железа(III) аммония сульфата раствора 10 % (железоаммонийных квасцов) образуется черно-зеленое окрашивание (дубильные вещества).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье* – не более 14 %.

Зола общая. *Цельное сырье* – не более 3 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье* – не более 0,8 %.

Посторонние примеси

Другие части растения (листья, кусочки стеблей). *Цельное сырье* – не более 0,25 %.

Плоды, недозрелые, твердые и пригоревшие. *Цельное сырье* – не более 1 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье* – не более 2 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье* – не более 0,3 %.

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».

Федеральная электронная медицинская библиотека ЭМБ

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

Количественное определение. *Цельное сырье:* сумма антоцианов в пересчете на цианидин-3-гликозид – не менее 0,5 %.

Спирт 60 %, содержащий хлористоводородной кислоты 1 %. К 126 мл спирта 96 % прибавляют 5,5 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, доводят объем раствора водой до 200 мл.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл спирта 60 %, содержащего хлористоводородной кислоты 1 %. Колбу закрывают пробкой и взвешивают с точностью до ± 0,01 г, затем присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 60 мин, затем охлаждают до комнатной температуры, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент спиртом 60 %, содержащим хлористоводородной кислоты 1 %. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр (раствор А).

1,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 96 %, содержащим хлористоводородную кислоту 1 %, до метки и перемешивают (раствор Б).

Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре при длине волны 546 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл спирта 60%, доведенный спиртом 96 % содержащим хлористоводородной кислоты 1 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3-О-гликозид в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)}$$

где A – оптическая плотность раствора Б;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения цианидин-3-О-гликозида при длине волны 546 нм, равный 600;

a – навеска сырья, г;

W – влажность, %.

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».

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

Шалфея лекарственного листья	**ФС.2.5.0051.15**
Salviae officinalis folia	**Взамен ГФ XI, вып. 2, ст. 22**
	(изм. № 1 от 25.06.1997)

Собранные в течение лета, высушенные и обмолоченные листья культивируемого полукустарника шалфея лекарственного – *Salvia officinalis* L., сем. яснотковых – *Lamiaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Цельные или частично измельченные листья размером от 1 до 35 мм с черешком или без черешка с небольшим количеством других частей растения (кусочки стеблей, цветков с цветоножками и без них). Поверхность листьев равномерно-морщинистая или мелкоячеистая с густой сетью жилок, сильно вдавленных сверху и выступающих снизу; покрыта длинными волосками, особенно с нижней стороны. Край листа мелкогородчатый. Черешок цилиндрической формы, опушенный, серовато-зеленый или серебристо-белый. Кусочки стеблей четырехгранные, опушенные; цветки с двугубой опушенной чашечкой и двугубым сине-фиолетовым венчиком. Редко встречаются округлые гладкие черные или черно-коричневые семена.

Цвет листьев – зеленый, серовато-зеленый, зеленовато-серый или серебристо-белый; чашечки – светло-коричневый, зеленовато-коричневый, часто с красновато-фиолетовым оттенком; венчика – сине-фиолетовый или фиолетово-коричневый. Запах ароматный. Вкус водного извлечения горьковато-пряный, слегка вяжущий.

Измельченное сырье. Кусочки листьев с кусочками листовых черешков,

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

с небольшим количеством кусочков стеблей, реже цветков с цветоножками и без них, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.

При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки листьев с многочисленными волосками, особенно с нижней стороны; кусочки стеблей, более или менее опушенные, зеленовато-серые, зеленовато-коричневые, светло-коричневые, часто желтовато-белые (эпидермис отделен при измельчении), нередко продольно-расщепленные с белой губчатой сердцевиной; цельные светло-коричневые, зеленовато-коричневые, часто с красновато-фиолетовым оттенком чашечки или их кусочки с многочисленными железками на поверхности; кусочки сине-фиолетового или фиолетово-коричневого венчика; округлые гладкие черные или черно-коричневые семена.

Цвет измельченного сырья серовато-зеленый, зеленовато-серый или серебристо-белый с зеленовато-коричневыми, светло-коричневыми, желтовато-белыми, белыми, красновато-фиолетовыми и редкими коричневыми вкраплениями. Запах ароматный. Вкус водного извлечения горьковато-пряный, слегка вяжущий.

Порошок. Кусочки листьев, черешков, стеблей, цветков, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

При рассмотрении порошка под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки листьев с многочисленными волосками, особенно с нижней стороны; кусочки стеблей, более или менее опушенные, зеленовато-серые, зеленовато-коричневые, светло-коричневые, часто желтовато-белые (эпидермис отделен при измельчении), продольно-расщепленные с белой губчатой сердцевиной; кусочки чашечки с многочисленными железками на поверхности, светло-коричневые, зеленовато-коричневые, часто с красновато-фиолетовым оттенком; кусочки сине-фиолетового или фиолетово-коричневого венчика; гладкие черные или черно-коричневые кусочки семян.

Цвет порошка зеленый, серовато-зеленый, зеленовато-серый или

серебристо-белый с зеленовато-коричневыми, светло-коричневыми, желтовато-белыми, белыми, красновато-фиолетовыми и редкими коричневыми вкраплениями. Запах ароматный. Вкус водного извлечения горьковато-пряный, слегка вяжущий.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении листа с поверхности видны клетки верхнего эпидермиса, которые имеют многоугольную форму со слабоизвилистыми стенками, клетки нижнего эпидермиса также многоугольной формы, более извилистостенные. Устьица расположены, главным образом, на нижней стороне листа, окружены 2 околоустьичными клетками, расположенными перпендикулярно устьичной щели (диацитный тип). Над жилкой клетки эпидермиса вытянутые, их стенки почти прямые. Эфирномасличные железки располагаются с обеих сторон листовой пластинки, округлой формы, с просвечивающейся ножкой и трудно различимыми, радиально расходящимися 6 – 8 выделительными клетками, заполненными бесцветным или желтоватым эфирным маслом. Волоски простые и головчатые. Простые волоски многочисленные. Головчатые волоски мелкие, состоят из короткой 1-, 3-клеточной ножки и шаровидной 1-, 2-клеточной головки, лучше заметны по краю и по жилке листа.

Клетки эпидермиса черешка прозенхимной формы. Эпидермис опушен многочисленными простыми и головчатыми волосками. Простые волоски многоклеточные. Головчатые волоски состоят из короткой 1-, 3-клеточной ножки и шаровидной одноклеточной головки. По эпидермису черешка встречаются эфирномасличные железки округлой формы, с просвечивающейся ножкой и трудно различимыми, радиально расходящимися 6 – 8 выделительными клетками и бесцветными или желтоватыми каплями эфирного масла. Механическая ткань на поперечном срезе представлена уголковой колленхимой, расположенной в 1 – 3 слоя под эпидермисом, в ушках – в 3 – 5 слоев. Проводящая система представлена 3 закрытыми коллатеральными пучками, наиболее крупный из них располагается в центре черешка и 2 более мелких – в боковых выростах.

Центральный пучок окружает нечетко выраженный слой эндодермы.

Измельченное сырье. При рассмотрении микропрепаратов видны фрагменты листовой пластинки с многоугольными слабоизвилистыми эпидермальными клетками (верхний эпидермис) и многоугольными извилистостенными эпидермальными клетками (нижний эпидермис); с устьицами диацитного типа, расположенными чаще на нижней стороне листовой пластинки. Встречаются фрагменты листа и черешка с простыми и головчатыми волосками, с эфирномасличными железками.

Многочисленные волоски 2 типов: простые многоклеточные, нижние клетки их (чаще 2 – 4) короткие, со значительно утолщенными стенками, верхняя клетка длинная, изогнутая, с тонкими стенками, и головчатые – мелкие, с короткой 1-, 3-клеточной ножкой и шаровидной 1-, 2-клеточной головкой. Эфирномасличные железки округлой формы с просвечивающейся ножкой и трудно различимыми, радиально расходящимися 6 – 8 выделительными клетками, заполненными бесцветным или желтоватым эфирным маслом.

Порошок. При рассмотрении микропрепаратов видны фрагменты верхнего и нижнего эпидермиса с мелкими клетками многоугольной формы с прямыми или извилистыми стенками, с устьицами диацитного типа и без них, с эфирномасличными железками и без них, с простыми многоклеточными и головчатыми волосками и без них; отдельные отпавшие простые и головчатые волоски и эфиромасличные железки; а также фрагменты черешка характерного строения.

Федеральная ФЭМБ
медицинская электронная
библиотека

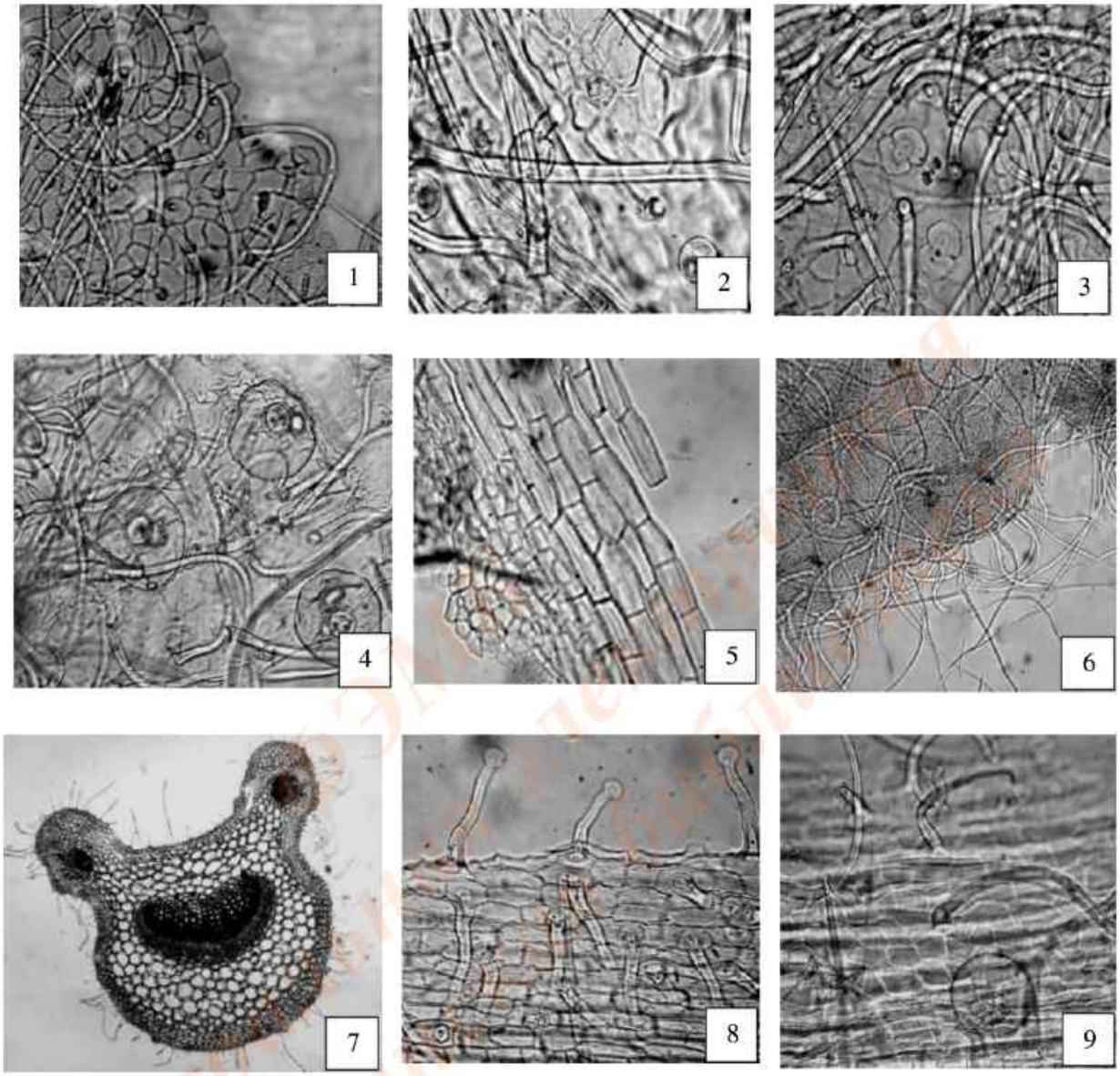


Рисунок – Шалфея листья.

1 – фрагмент верхнего эпидермиса листа с простыми волосками (300×), 2 – фрагмент верхнего эпидермиса листа с простыми и головчатыми волосками (600×), 3 – фрагмент нижнего эпидермиса листа с простыми волосками, устьицами диацитного типа (300×), 4 – фрагмент нижнего эпидермиса листа с эфирномасличными железками (вид сверху) (300×), 5 – фрагмент эпидермиса вдоль жилки листа (300×), 6 – фрагмент края листа с простыми волосками (120×), 7 – поперечный срез черешка листа (80×), 8 – фрагмент эпидермиса черешка листа с головчатыми волосками (200×), 9 – фрагмент эпидермиса черешка листа с простыми волосками и эфирномасличной железкой (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

1. ***Тонкослойная хроматография***

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) лютеолин-7-гликозида. Около 0,1 г СО лютеолин-7-гликозида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 85 мл спирта 70 % и нагревают на водяной бане до полного растворения. Затем охлаждают, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают. Срок годности раствора 3 мес.

Раствор СО цинеола. Около 0,1 г СО цинеола помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в 8 мл спирта 70 %, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор для детектирования. Ванилина раствор спиртовой 1 % и серной кислоты раствор спиртовой 10 % смешивают в равных частях. Раствор используют свежеприготовленным.

1. Около 0,5 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 25 мл спирта 70 % и взвешивают с погрешностью ± 0,01 г. Колбу присоединяют к обратному водяному холодильнику, нагревают на кипящей водяной бане в течение 45 минут, периодически встряхивают для смывания частиц сырья со стенок. Колбу с содержимым искусственно охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и при необходимости доводят до первоначальной массы спиртом 70 %. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр, смоченный тем же спиртом, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором на алюминиевой подложке размером 10 × 10 см наносят 10 мкл испытуемого раствора, рядом наносят 5 мкл раствора СО лютеолин-7-гликозида. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе в течение 5 мин, помещают в камеру (без предварительного насыщения) с системой растворителей этилацетат – муравьиная кислота безводная – вода (70:15:15) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителя пройдет около 80 – 90 %

длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, затем обрабатывают алюминия хлорида раствором 5 % в спирте 70 %, после чего просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО лютеолин-7-гликозида должна обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией желтого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией желтого цвета на уровне зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО лютеолин-7-гликозида; допускается обнаружение дополнительных зон адсорбции (флавоноиды).

2. На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля размером 5 × 15 см на алюминиевой подложке наносят 5 мкл раствора эфирного масла листьев шалфея (см. раздел «Количественное определение. Эфирное масло») в спирте 96 % (1:10) и 10 мкл раствора СО цинеола. Пластинку с нанесенными пробами сушат, помещают в камеру с системой растворителей толуол – этилацетат (93:7) (без предварительного насыщения) 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. Пластинку выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100 °С в течение 5 мин, после чего просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО цинеола должна обнаруживаться зона адсорбции синего цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться: зона адсорбции синего цвета на уровне зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО цинеола, 2 зоны адсорбции сине-фиолетового цвета ниже зоны цинеола, зона адсорбции синего цвета ниже зоны цинеола, зона адсорбции красно-фиолетового цвета выше зоны цинеола, зона адсорбции красно-

коричневого цвета выше зоны цинеола, допускается обнаружение дополнительных зон адсорбции (терпеноиды).

2. К 2 – 3 мл испытуемого раствора А (см. раздел «Количественное определение дубильных веществ») прибавляют 2 капли железа(III) аммония сульфата раствора 10 % (железоаммониевых квасцов), раствор окрашивается в черно-зеленый цвет (дубильные вещества).

ИСПЫТАНИЯ

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

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 12 %.

Зола, не растворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 3 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 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

Изменившие окраску (потемневшие и почерневшие) кусочки листьев. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 5 %.

Другие части растения (цветки и кусочки стеблей). *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 13 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3 %.

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:* эфирного масла – не менее 0,8 %, *порошок:* эфирного масла – не менее 0,6 %, дубильных веществ в пересчете на танин – не менее 4,5 %, экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 50 %, – не менее 30 %.

Определение эфирного масла проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1 или 2, навеска сырья – 30,0 г, сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, время перегонки – 2 ч.)

Определение дубильных веществ в пересчете на танин проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1).

Определение экстрактивных веществ проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1; экстрагент – спирт 50 %).

Примечание. Определение эфирного масла и дубильных веществ

проводят для сырья, предназначенного для производства лекарственных растительных препаратов (пачки, фильтр-пакеты); определение эфирного масла проводят в сырье, предназначенном для получения эфирного масла; определение экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 50 %, проводят для сырья, предназначенного для производства экстрактов.

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».

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

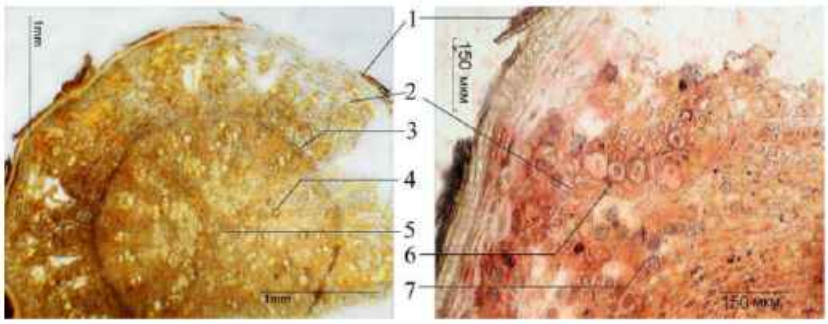
Щавеля конского корни	**ФС.2.5.0052.15**
Rúmicis conférti radices	**Взамен ВФС 42-1077-81**

Собранные осенью или весной, тщательно отмытые и высушенные корни дикорастущего многолетнего травянистого растения щавеля конского – *Rúmex confértus Willd*., сем. гречишных – *Polygonaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

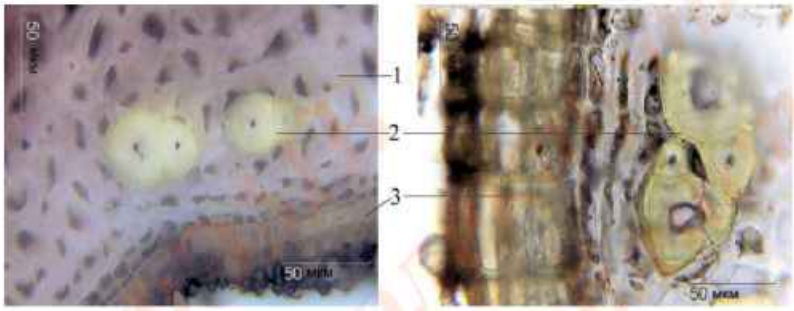
Внешние признаки. *Цельное сырье.* Цельные или продольно разрезанные корни, твердые, продольно-морщинистые, прямые или слегка изогнутые, длиной 3 – 10 см, толщиной 2 – 10 см. Излом неровный. Цвет снаружи – темно-коричневый, на изломе – желтовато-коричневый или серовато-коричневый, внутри – желто-оранжевый. Запах слабый, своеобразный. Вкус водного извлечения горьковатый, вяжущий.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении на поперечном срезе должно быть видно вторичное строение корня: пробковый слой состоит из старых слущивающихся слоев и новых слоев, состоящих из ровных 3 – 5 рядов клеток правильной прямоугольной формы. К центру от пробки находится основная паренхима коровой части корня, прямоугольные клетки которой имеют более или менее утолщенные клеточные стенки, неправильное очертание полостей и располагаются рядами – от 8 до 10. К центру от камбия расположены элементы вторичной ксилемы, а к периферии – вторичная флоэма. Во вторичной ксилеме хорошо заметны 3 – 4 широких первичных радиальных луча паренхимы, достигающих центра корня, первичной ксилемы.



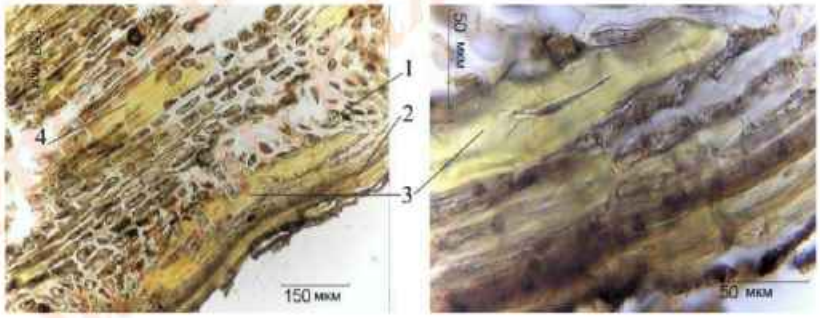
А Б

Рисунок 1 – Щавеля конского корни (поперечный срез).
А – общий вид (20×); Б – фрагмент коры (100×); окраска натрия гидроксида раствором 5 %. 1 – пробка; 2 – паренхима коры; 3 – камбий; 4 –сосуды ксилемы; 5 – первичная ксилема; 6 – каменистые клетки; 7 – друзы.



А Б

Рисунок 2 – Щавеля конского корни (продольный срез).
1 – паренхима коровой части; 2 – склереиды; 3 – пробка (400×).



А Б

Рисунок 3 – Щавеля конского корни (продольный срез). Коровая часть.
А – общий вид (100×); Б – паренхима коровой части (400×). 1 – паренхима коровой части; 2 – пробка; 3 – склереиды; 4 – лубяные волокна.

На продольном срезе коровой части хорошо заметны элементы механической ткани – склереиды. Они представлены клетками округлой

формы, желтого цвета с серединным щелевидным просветом, в которых отсутствуют или изредка присутствуют поровые каналы.

Лубяные волокна локализуются во флоэме корня и в поперечном сечении имеют продолговатую, прозенхимную форму.

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля на алюминиевой или полимерной подложке размером 10 × 15 см наносят 10 мкл испытуемого раствора (см. раздел «Количественное определение» приготовление раствора Б испытуемого раствора) и рядом 20 мкл раствора стандартного образца (СО) 8-О-β-D-глюкозида эмодина (см. раздел «Количественное определение» приготовление раствора А СО 8-О-β-D-глюкозида эмодина). Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 1 ч смесью растворителей *н*-бутанол – уксусная кислота ледяная – вода (4:1:5), 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. Пластинку обрабатывают диазореактивом, нагревают при 100 – 105 °С в течение 5 мин и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции розового цвета на уровне зоны адсорбции розового цвета на хроматограмме раствора СО 8-О-β-D-глюкозида эмодина; допускается обнаружение других зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье* – не более 13 %.

Зола общая. *Цельное сырье* – не более 10 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье* – не более 5 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Корневища с остатками неотделенных стеблей. *Цельное сырье* – не более 5 %.

Кусочки корней короче 2 см. *Цельное сырье* – не более 3 %.

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

Минеральная примесь. *Цельное сырье* – 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:* сумма антраценпроизводных в пересчете на 8-О-β-D-глюкозид эмодина – не менее 3 %.

Приготовление растворов.

Раствор СО 8-О-β-D-глюкозида эмодина. Около 0,02 г (точная навеска) СО 8-О-β-D-глюкозида эмодина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 30 мл спирта 96 % при нагревании. Затем содержимое колбы охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор А СО 8-О-β-D-глюкозида эмодина). Срок годности раствора 30 сут.

1,0 мл раствора А СО 8-О-β-D-глюкозида эмодина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора щелочно-аммиачным раствором до метки, перемешивают, затем раствор переносят в колбу вместимостью 50 мл и нагревают с обратным холодильником на кипящей

водяной бане в течение 15 мин и охлаждают (раствор Б СО 8-О-β-D-глюкозида эмодина).

Щелочно-аммиачный раствор. 50,0 г натрия гидроксида растворяют при перемешивании в 870 мл воды. После охлаждения к раствору прибавляют 80 мл аммиака раствора концентрированного и перемешивают. Срок годности раствора 1 сут.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл спирта 70 %. Колбу закрывают пробкой и взвешивают с точностью до ± 0,01 г, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 90 мин. Затем охлаждают в течение 30 мин, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр (раствор А испытуемого раствора)

1,0 мл раствора А испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора щелочно-аммиачным раствором до метки, перемешивают и нагревают в течение 15 мин на кипящей водяной бане с обратным холодильником (раствор Б испытуемого раствора). После охлаждения измеряют оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 520 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют: 1 мл спирта 70 % помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора щелочно-аммиачным раствором до метки, перемешивают и нагревают в течение 15 мин на кипящей водяной бане с обратным холодильником.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО 8-О-β-D-глюкозида эмодина. В качестве раствора сравнения используют: 1 мл спирта 96 % помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем щелочно-аммиачным раствором до метки, перемешивают, помещают в

мерную колбу вместимостью 50 мл и нагревают в течение 15 мин на кипящей водяной бане с обратным холодильником.

Содержание суммы антраценпроизводных в пересчете на 8-О-β-D-глюкозида эмодин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 50 \cdot a_0 \cdot 1 \cdot P \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 1 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100 \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
A_o – оптическая плотность раствора Б СО 8-О-β-D-глюкозида эмодина;
a – навеска сырья, г;
a_o – навеска СО 8-О-β-D-глюкозида эмодина, г;
P – содержание основного вещества в СО 8-О-β -D-глюкозида эмодина, %;
W – влажность сырья, %.

Допускается содержание суммы антраценпроизводных в пересчете на 8-О-β-D-глюкозида эмодин вычислять с использованием удельного показателя поглощения 8-О-β-D-глюкозида эмодина с щелочно-аммиачным раствором по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 50 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)}$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения 8-О-β-D-глюкозида эмодина с щелочно-аммиачным раствором при длине волны 520 нм, равный 160;
a – навеска сырья, г;
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».

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Элеутерококка колючего корневища и корни **ФС.2.5.0053.15**

Eleutherococci senticosi rhizomata et radices **Взамен ФС 42-0191-06**

Собранные осенью, тщательно очищенные от земли, разрубленные на куски и высушенные корневища и корни дикорастущего кустарника элеутерококка колючего – *Eleutherococcus senticosus* (*Rupr. et Maxim.*), сем. аралиевых – *Araliaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Куски корневищ и корней, цельные или расщепленные вдоль, длиной до 8 см, толщиной до 4 см, деревянистые, твердые, прямые или изогнутые, иногда разветвленные. Кора тонкая, плотно прилегает к древесине. Корневища с поверхности гладкие или слабо-продольно-морщинистые с пазушными почками и следами отмерших стеблей и обломанных корней. Поверхность корней более гладкая со светлыми поперечными бугорками. Излом длинноволокнистый, светло-желтого или бледно-коричневого цвета. Корневища с поверхности светло-коричневые, корни – более темные. Запах слабый, ароматный. Вкус водного извлечения слегка жгучий.

Измельченное сырье. Кусочки корневищ и корней различной формы, светло-желтого или кремового цвета с коричневыми вкраплениями, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 5 мм. Запах слабый, ароматный. Вкус водного извлечения слегка жгучий.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Порошок. Кусочки корневищ и корней различной формы, светло-желтого или кремового цвета с коричневыми вкраплениями, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Запах слабый, ароматный. Вкус водного извлечения слегка жгучий.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении поперечного среза корневища или корня должна быть видна перидерма с многослойной коричневой пробкой, среди крупных клеток паренхимы коры, содержащих друзы оксалата кальция, расположены секреторные каналы, лубяные волокна и сердцевинные лучи. Сердцевинные лучи многорядные, как правило, шириной в 2 – 3 клетки, в древесине – прямые, в коре – извилистые. Клетки центральной части сердцевинных лучей, расположенных в коре, нередко содержат мелкие друзы оксалата кальция. Кора отделена от древесины слоем камбия. Древесина широкая, как правило, кольцесосудистая.

Секреторные каналы многочисленные, выстланы 4 – 5 эпителиальными клетками, просветы их заполнены коричневым или оранжево-коричневым содержимым. В корне каналы мелкие, диаметр каналов не меняется по всей ширине коры. В корневище каналы 2 типов: более крупные каналы располагаются на границе феллодермы и лубяной части коры, мелкие (как у корня) – находятся в лубяной части коры.

Лубяные волокна с толстыми одревесневшими стенками располагаются, как правило, группами.

В клетках паренхимы коры должны быть видны многочисленные друзы оксалата кальция; крахмальные зерна содержатся только в клетках паренхимы, окружающих секреторные каналы, и в клетках сердцевинных лучей (в отличие от других представителей семейства Аралиевых, у которых крахмальные зерна заполняют все клетки паренхимы коры).

Древесина состоит из крупных сосудов и склеренхимных волокон (либриформ). Клетки сердцевинных лучей, реже – либриформа, заполнены крахмальными зернами, могут быть видны капли эфирного масла.

Электронный архив библиотеки ГомГМУ

Корневище, в отличие от корня, имеет сердцевину, состоящую из крупных неодревесневших паренхимных клеток.

Измельченное сырье и порошок. При рассмотрении давленого микропрепарата должны быть видны группы сетчатых сосудов с окаймленными порами, редко – фрагменты спиральных сосудов; многочисленные склеренхимные волокна с внутренними перегородками; фрагменты сердцевинных лучей в виде групп округлых клеток с утолщенными пористыми стенками; лубяные волокна с толстыми одревесневшими пористыми стенками; группы паренхимных клеток, содержащих друзы оксалата кальция; фрагменты коры с секреторными каналами в виде коричневых или желтовато-коричневых трубок; фрагменты пробки, состоящей из крупных клеток с утолщенными стенками; часто в клетках либриформа и сердцевинных лучей видны капли эфирного масла.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

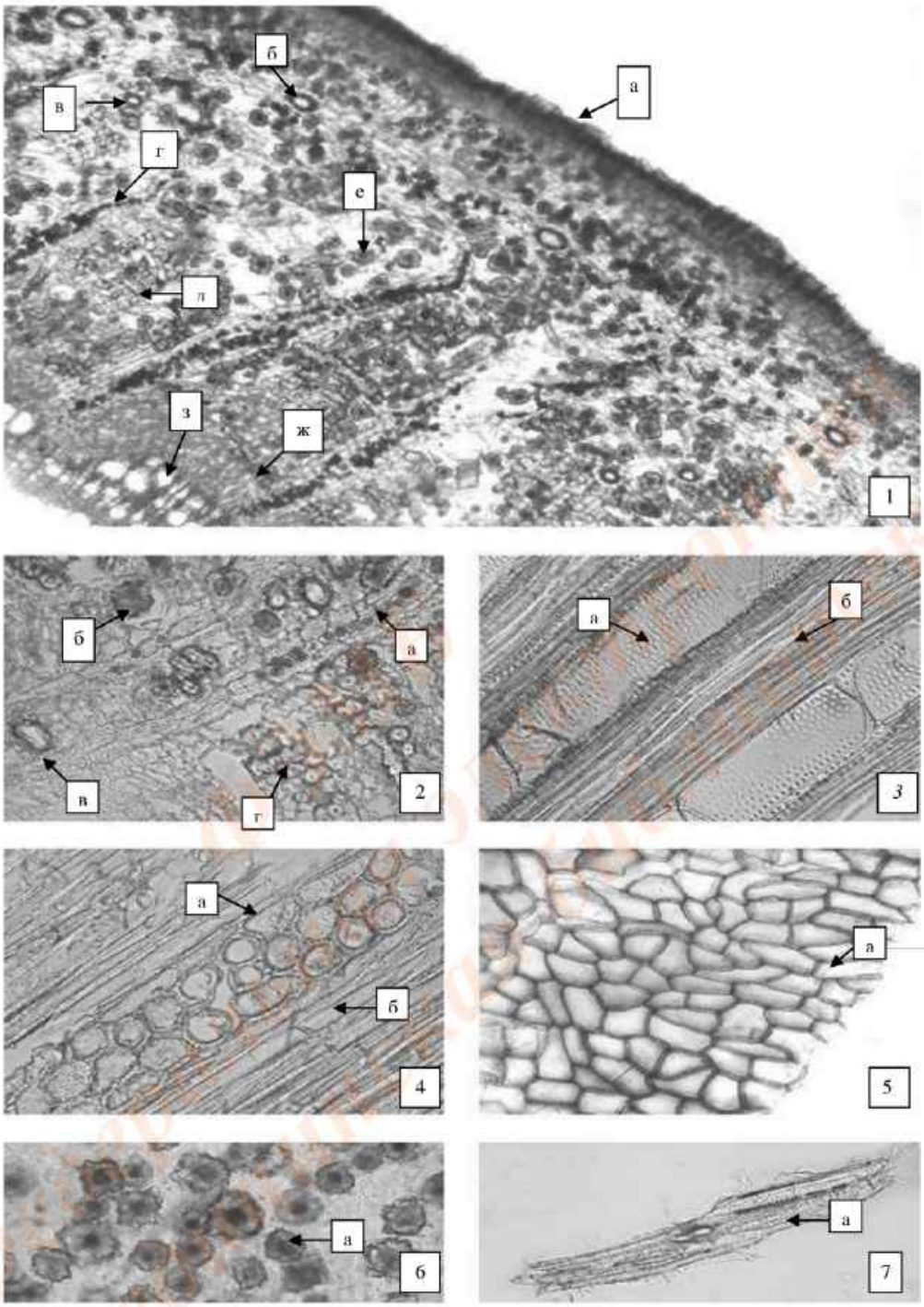


Рисунок – Элеутерококка колючего корневища и корни.
1 – фрагмент поперечного среза корневища: а – многослойная пробка, б – крупный секреторный канал на границе феллодермы и лубяной части коры, в – мелкий секреторный канал в лубяной части коры, г – извилистый сердцевинный луч, д – группы лубяных волокон, е – друзы оксалата кальция, ж – камбий, з – сосуды ксилемы (30×); 2 – фрагмент лубяной части коры поперечного среза корневища: а – сердцевинный луч, б – друзы оксалата кальция, в – мелкие секреторные каналы, г – группы лубяных волокон (200×);

3 – фрагмент продольно-тангентального среза древесины корневища: а – сетчатые сосуды с окаймленными порами, б – склеренхимные волокна (200×); 4 – фрагмент продольно-тангентального среза древесины корневища: а – сердцевинный луч, б – склеренхимные волокна (200×); 5 – давленый препарат: а – фрагмент пробки, состоящей из крупных клеток с утолщенными стенками (200×); 6 – давленый препарат: а – паренхимные клетки с друзами оксалата кальция (200×); 7 – давленый препарат: а – группа склеренхимных волокон коры с утолщенными пористыми стенками (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

1. *Тонкослойная хроматография*

Серная кислота раствор спиртовой 10 %,. К 90 мл спирта 96 % приливают 10 мл серной кислоты концентрированной. Срок годности раствора не более 30 сут.

Около 2,5 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 15 мл смеси спирт 96 % – вода (1:1 о/о) и нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 30 мин. После охлаждения до комнатной температуры полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля на алюминиевой подложке размером 10 × 10 см наносят 20 мкл испытуемого раствора и 10 мкл раствора стандартного образца (СО) элеутерозида В (см. раздел «Количественное определение – «Элеутерозида В», раствор А). Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре в течение 5 мин, затем помещают в камеру (выложенную изнутри фильтровальной бумагой), предварительно насыщенную в течение 30 мин смесью растворителей хлороформ – метанол – вода (70:30:4), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, пластинку вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей в вытяжном шкафу.

Пластинку обрабатывают серной кислоты раствором спиртовым 10 %,

нагревают в сушильном шкафу при 100 – 105 °С в течение 2 – 3 мин и просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО элеутерозида В должна обнаруживаться зона адсорбции серого или серого с фиолетовым оттенком цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться следующие зоны адсорбции (снизу вверх от линии старта): 2 ярко выраженные зоны темно-серого цвета; зона серо-коричневого цвета, зона серого или серого цвета с фиолетовым оттенком на уровне зоны на хроматограмме раствора СО элеутерозида В; допускается обнаружение дополнительных слабовыраженных зон адсорбции серого, серого с фиолетовым оттенком или коричневого цвета.

2. ***Высокоэффективная жидкостная хроматография***

Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора, полученного при количественном определении (см. раздел «Количественное определение – «Элеутерозида В»), должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме раствора СО элеутерозида В.

3. В коническую колбу вместимостью 25 мл помещают 0,5 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, прибавляют 10 мл горячей воды, нагревают на плитке в течение 5 мин и фильтруют. К 1 мл полученного извлечения прибавляют несколько капель железа(III) хлорида раствора 1 %, появляется зелёное окрашивание (полифенольные соединения).

ИСПЫТАНИЯ

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

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 8 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье,*

измельченное сырье, порошок – не более 1 %.

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

Остатки стеблей, в том числе отделенные при анализе. *Цельное сырье* – не более 1,5 %.

Потемневшие в изломе корневища и корни. *Цельное сырье* – не более 3 %.

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

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

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: суммы элеутерозидов в пересчете на элеутерозид В – не менее 0,3 %; элеутерозида В – не менее 0,03 %.

Элеутерозид В

Приготовление растворов.

Раствор СО элеутерозида В. Около 10,0 мг (точная навеска) СО элеутерозида В растворяют в спирте 96 % в мерной колбе вместимостью 50 мл, доводят объем раствора смесью спирт 96 % – вода (1:1, о/о) до метки и перемешивают (раствор А).

5,0 мл раствора А переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора смесью спирт 96 % – вода (1:1, о/о) до метки и перемешивают (раствор В).

Срок годности растворов не более 3 мес при хранении в плотно укупоренной таре в прохладном, защищенном от света месте.

Приготовление раствора фосфорной кислоты концентрированной в воде. Смешивают фосфорную кислоту концентрированную с водой для хроматографии в объемном соотношении (0,5:99,5). Приготовленный раствор фильтруют под вакуумом через мембранный фильтр с порами размером не более 0,45 мкм.

Проверка пригодности хроматографической системы.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- фактор асимметрии пика элеутерозида В должен находиться в пределах от 0,8 до 1,5;
- эффективность хроматографической колонки должна быть не менее 5000 теоретических тарелок.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм. Около 2,5 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл смеси спирт 96 % – вода (1:1) и нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 30 мин. После охлаждения извлечение осторожно (без перемешивания) фильтруют через ватный тампон средней плотности, избегая попадания частиц на вату, в мерную колбу вместимостью 100 мл. Извлечение повторяют дважды, используя каждый раз 25 мл смеси спирт 96 % – вода (1:1), при этом ватный тампон для фильтрования не меняют. Объем извлечения в мерной колбе доводят смесью спирт 96 % – вода (1:1, о/о) до метки, одновременно

промывая остаток сырья в колбе, и перемешивают.

Около 2 – 3 мл полученного извлечения фильтруют через нейлоновый фильтр (с размером пор 0,45 мкм), отбрасывая первые 1 – 2 мл фильтрата (испытуемый раствор).

Условия хроматографирования

Колонка	нержавеющая сталь, 250 × 4,6 мм, эндкеппированный октадецилсилилсиликагель (С18) для хроматографии (5 мкм)
Предколонка	соответствует используемой колонке, эндкеппированный октадецилсилилсиликагель (С18) для хроматографии (5 мкм)
Подвижная фаза	А – раствор фосфорной кислоты концентрированной в воде. В – ацетонитрил для хроматографии.
Способ элюирования	программа градиента

Время, мин	А, об. %	В, об. %
0 – 5	90	10
5 – 27	90→80	10→20
27 – 30	80→50	20→50
30 – 35	50	50
35 – 40	50→90	50→10
40 – 45	90	10

Скорость потока, мл/мин	1
Температура Колонки, °С	20 ± 2
Детектор	УФ-спектрофотометрический или диодная матрица
Длина волны, нм	266
Объем вводимой Пробы, мкл	10

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Время хроматографирования, мин	30

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

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

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot 5 \cdot 100}{S_0 \cdot 50 \cdot 100 \cdot a} \cdot \frac{100 \cdot 100}{100 - W} \cdot \frac{P}{100} = \frac{S \cdot a_0}{S_0 \cdot a} \cdot \frac{10 \cdot P}{100 - W}$$

где S – площадь пика элеутерозида В на хроматограмме испытуемого раствора;

S_o – площадь пика элеутерозида В на хроматограмме раствора СО элеутерозида В;

a – навеска сырья, мг;

a_o – навеска СО элеутерозида В, мг;

P – содержание основного вещества в СО элеутерозида В, %;

W – влажность сырья, %.

Сумма элеутерозидов

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл и проводят фракционное извлечение последовательно 2 раза спиртом 70 % и 2 раза спиртом 96 % порциями по 20 мл. Каждое извлечение проводят на магнитной мешалке при нагревании до температуры не выше 50 °С в течение 1 ч. Извлечения фильтруют через бумажный фильтр в круглодонную колбу вместимостью 100 мл и отгоняют спирт на роторном испарителе под вакуумом досуха. К сухому остатку в колбе прибавляют 10 мл воды и 10 мл углерода тетрахлорида. Содержимое колбы тщательно перемешивают и

Федеральный ЭМБ Электронная медицинская библиотека

количественно переносят в делительную воронку вместимостью 100 мл. Колбу дважды промывают углерода тетрахлоридом порциями по 5 мл и смывы присоединяют к содержимому в делительной воронке. Затем в колбу прибавляют 10 мл смеси хлороформ – спирт 96 % (5:1), перемешивают и оставляют на 10 мин.

В делительной воронке проводят очистку водной фазы трехкратным извлечением углерода тетрахлоридом порциями по 10 мл, отбрасывая каждый раз слой углерода тетрахлорида. К очищенной водной фазе в делительной воронке прибавляют 20 мл смеси хлороформ – спирт 96 % (5:1) (из них 10 мл из колбы для отгона) и извлекают элеутерозиды в течение 5 мин. Нижний слой фильтруют через бумажный фильтр, содержащий 2,0 г натрия сульфата безводного, в мерную колбу вместимостью 100 мл. Извлечение элеутерозидов в делительной воронке повторяют еще 4 раза той же смесью последовательно порциями 15, 15, 10 и 10 мл, собирая извлечения в ту же мерную колбу. Объем раствора в колбе доводят смесью хлороформ – спирт 96 % (5:1) до метки и перемешивают (раствор А).

20,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора смесью хлороформ – спирт 96 % (5:1) до метки и перемешивают (раствор Б).

Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре в при длине волны 278 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют смесь хлороформ – спирт 96 % (5:1).

Содержание суммы элеутерозидов в пересчете на элеутерозид В в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 50 \cdot 100}{A_{1см}^{1\%} \cdot a \cdot 20 \cdot (100 - W)}$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора Б;

$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения элеутерозида В при длине волны 278 нм, равный 302;

1,42 – коэффициент пересчета на сумму элеутерозидов;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Примечание. Определение суммы элеутерозидов в пересчете на элеутерозид В проводят для сырья, предназначенного для производства экстрактов.

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».

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Эрвы шерстистой трава	**ФС.2.5.0054.15**
Aervae lanatae herba	**Взамен ФС 42-3635-98**

Собранная в фазу цветения – начала плодоношения высушенная трава культивируемого растения эрвы шерстистой – *Aerva lanata* (L.) *Juss*., сем. амарантовых – *Amaranthaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Куски олиственных стеблей с соцветиями, куски олиственных стеблей часто с корнями, отдельные цельные или частично измельченные листья, соцветия и корни, отдельные цельные цветки, плоды, семена.

Стебли цилиндрические, диаметром до 1 см, со слабовыраженными более светлыми ребрышками, опушенные. На изломе видна белая губчатая сердцевина.

Листья короткочерешковые, яйцевидные или эллиптические, на верхушке заостренные или тупые, цельнокрайние, опушенные (снизу более интенсивно), длиной до 2,5 см, шириной до 1,5 см. Соцветие колосовидное, войлочно-опушенное. Цветонос усажен мелкими пленчатыми прицветными листочками широкоовальной формы с остевидным выростом на верхушке. Цветки мелкие невзрачные, цилиндрические или слегка колокольчатые с простым пленчатым околоцветником из сухих беловато-зеленых листочков эллиптической формы; 5 тычинок с двугнездными пыльниками.

Завязь верхняя, пестик с коротким столбиком и двухлопастным рыльцем. Плод – односемянная коробочка. Семена бобовидные, черные,

Федеральный электронный медицинский библиотека

блестящие, очень мелкие (около 1 мм).

Корни стержневые, с боковыми ответвлениями тонких придаточных корней. Поверхность главного корня продольно-морщинистая, боковых ответвлений – почти гладкая.

Цвет стеблей серовато-зеленый, нередко с желтоватым оттенком, с продольными более светлыми ребрами. Цвет листьев зеленый или желтовато-зеленый, снизу более светлый; цветков – беловато-зеленый или зеленовато-серый, плодов – от зеленого до светло-коричневого; корней – снаружи беловато-серый или беловато-желтый, на изломе – белый.

Запах слабый. Вкус водного извлечения горьковатый с ощущением слизистости.

Измельченное сырье. Кусочки листьев, стеблей, соцветий, корней, цельные семена, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 5 мм.

Цвет зеленовато-серый с зелеными, светло-коричневыми, беловато-желтыми и редко белыми вкраплениями.

Запах слабый. Вкус водного извлечения горьковатый с ощущением слизистости.

Микроскопические признаки. *Цельное, измельченное сырье.* При рассмотрении микропрепаратов листа с поверхности должны быть видны мелкие клетки эпидермиса с прямыми или слегка извилистыми стенками с верхней стороны листа, с более извилистыми стенками – с нижней стороны листа; устьица на обеих сторонах листа (с нижней – многочисленные, с верхней – редкие) окружены 3 – 5 клетками эпидермиса (аномоцитный тип); в мезофилле многочисленные крупные друзы оксалата кальция. Жилки многочисленные, хорошо заметные, состоящие из коротких извилистых трахеид. На поверхности эпидермиса многочисленные простые многоклеточные волоски, состоящие из нескольких коротких клеток основания с гладкими стенками, и 2 – 5 длинных и более или менее

извилистых конечных клеток, оболочки которых имеют узкие шиповидные выросты. Сочленение клеток волосков характерное – зубчатое.

Клетки эпидермиса стебля над ребрами удлиненно-вытянутые с волосками (главным образом на верхних участках стебля) или только с их многоклеточными основаниями; клетки эпидермиса стебля в ложбинках между ребрами округло-многоугольные или вытянутые с устьицами характерного строения. Листочки околоцветника и прицветники пленчатые, клетки эпидермиса по краю – удлиненно-вытянутые, в средней части листочков имеется небольшой участок мезофилла, в прицветниках верхушка состоит из узких клеток, выступающих над пленчатой окраиной в виде ости; поверхность листочков покрыта многочисленными волосками такого же строения, как и на листьях. Пыльца мелкая, округлая, с 6 порами и гладкой экзиной. В стебле и черешке листа встречаются очень крупные друзы оксалата кальция.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

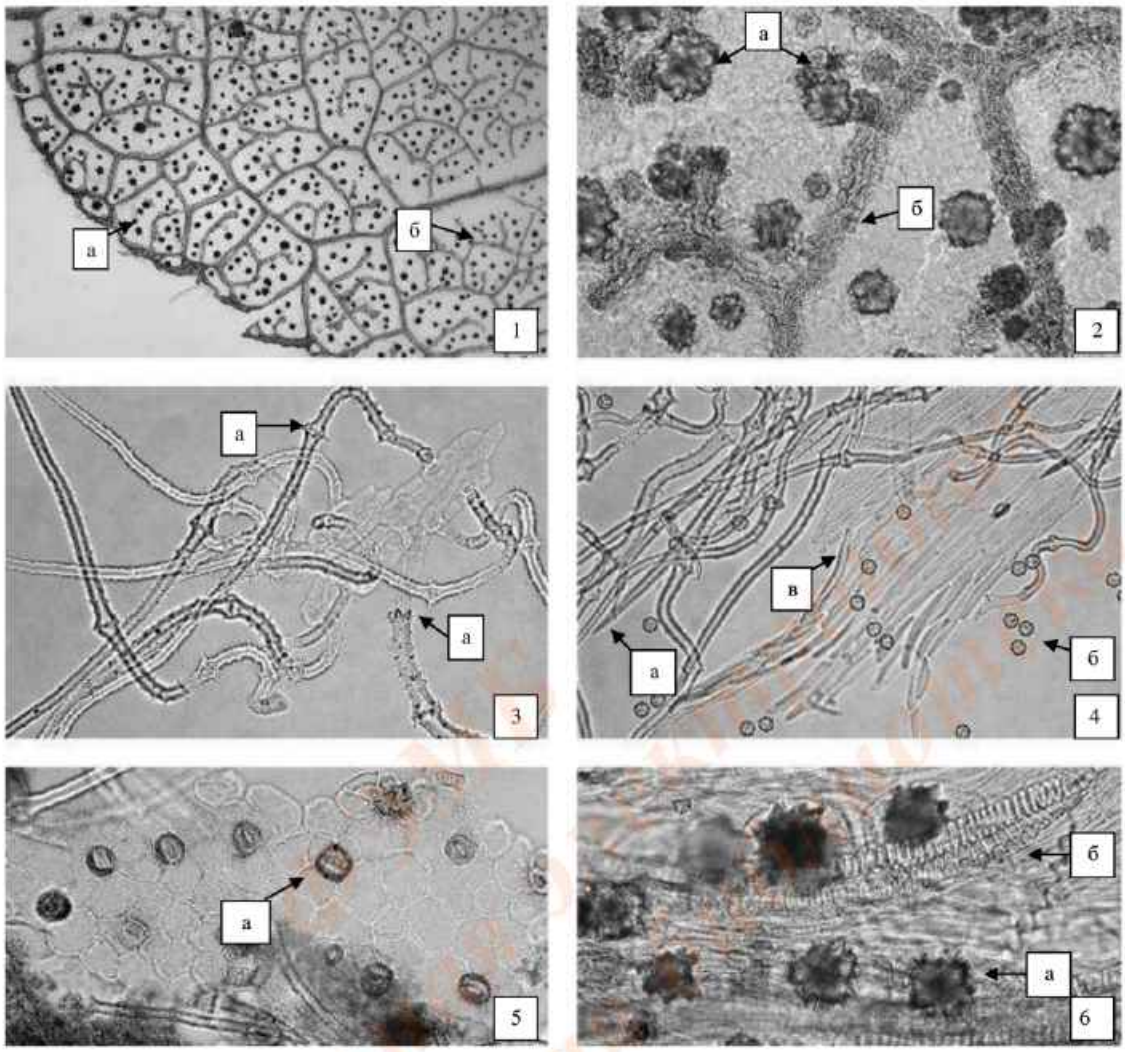


Рисунок – Эрвы шерстистой трава.
1 – фрагмент листовой пластинки: а – многочисленные друзы оксалата кальция, б – жилки (40×); 2 – фрагмент листовой пластинки: а – крупные друзы оксалата кальция, б – жилки (200×); 3 – фрагмент эпидермиса: а – волоски с характерным зубчатым сочленением (200×); 4 – фрагмент цветка: а – волоски, б – пыльца, в – пленчатый листочек околоцветника (200×); 5 – фрагмент эпидермиса с устьицами аномоцитного типа (а) (200×); 6 – фрагмент черешка: а – клетки с крупными друзами, б – спиральные сосуды (200×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор для детектирования 1. 1,0 г дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира растворяют в 100 мл спирта 96 %. Срок годности

раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор для детектирования 2. 5 мл полиэтиленгликоля (ПЭГ) 400 смешивают со 100 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 6 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

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.

Раствор СО кверцетина. Около 0,005 г СО кверцетина (кверцетина дигидрата) растворяют в 10 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около 1,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 15 мл спирта 80 % и кипятят с обратным холодильником на водяной бане в течение 10 мин. После охлаждения до комнатной температуры извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором на алюминиевой подложке размером 10 × 10 см наносят 40 мкл испытуемого раствора и в одну полосу по 5 мкл растворов СО рутина и СО кверцетина. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 30 мин смесью растворителей этилацетат – муравьиная кислота безводная – вода (12:2,5:3), 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. Пластинку выдерживают в сушильном шкафу при 100 – 105 °С в течение 3 – 5 мин, еще теплую обрабатывают последовательно раствором для детектирования 1 и раствором для детектирования 2, просматривают через 30 мин в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО рутина должна обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией желтого, желто-оранжевого или оранжевого цвета.

На хроматограмме раствора СО кверцетина должна обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией желтого, желто-оранжевого или оранжевого цвета выше зоны рутина.

На хроматограмме испытуемого раствора должно обнаруживаться не менее 4 зон адсорбции с флуоресценцией желтого, зелено-желтого, желто-оранжевого или оранжевого цвета ниже зоны рутина, зеленого или зелено-желтого цвета ниже зоны рутина, голубого цвета чуть ниже или на уровне зоны рутина, зеленого или зелено-желтого цвета выше зоны рутина; допускается обнаружение других зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 12 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 15 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 8 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 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 0,25 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Части сырья, изменившие окраску. *Цельное сырье* – не более 3 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3 %.

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

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:* суммы флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 0,5 %.

Приготовление растворов.

Раствор СО рутина. Около 0,05 г (точная навеска) СО рутина, предварительно высушенного при температуре 130 – 135 °С в течение 3 ч, растворяют в 50 мл спирта 96 % в мерной колбе вместимостью 100 мл при нагревании на кипящей водяной бане, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор А СО рутина). Срок годности раствора А 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 % и 0,1 мл уксусной кислоты разведенной 30 % в спирте 60 %, доведенного спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл (раствор Б СО рутина).

Алюминия хлорида раствор 2 % в спирте 60 %. 2,0 г алюминия хлорида безводного помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 50 мл спирта 60 %, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают. Срок годности раствора не более 6 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих через сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл спирта 60 %, колбу взвешивают с погрешностью ± 0,01 г, присоединяют к обратному холодильнику и

нагревают на кипящей водяной бане в течение 60 мин, периодически перемешивают содержимое. Колбу охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и при необходимости доводят объем раствора спиртом 60 % до первоначального. Около 40 мл полученного извлечения переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочный раствор осторожно (без перемешивания) фильтруют через бумажный складчатый фильтр, отбрасывая первые 15 мл фильтрата (раствор А испытуемого раствора).

2,0 мл раствора А испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл алюминия хлорида раствора 2 % в спирте 60 % и 0,1 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, доводят объем раствора спиртом 60 % до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора).

Оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора измеряют через 40 мин на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2 мл раствора А испытуемого раствора, 0,1 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, доведенный спиртом 60 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО рутина. В качестве раствора сравнения используют: 1 мл раствора А СО рутина, 0,1 мл уксусной кислоты разведенной 30 % и доведенный спиртом 60 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 25 \cdot a_0 \cdot 1 \cdot P \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 2 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100 \cdot (100 - W)} \cdot 100,$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
A_o – оптическая плотность раствора Б СО рутина;

a – навеска сырья, г;
a_o – навеска СО рутина, г;
P – содержание основного вещества в СО рутина, %;
W – влажность сырья, %.

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

$$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1см}^{1\%} \cdot a \cdot 2 \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при длине волны 410 нм, равный 248;
a – навеска сырья, г;
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».

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

Эхинацеи пурпурной трава	**ФС.2.5.0055.15**
Echinaceae purpureae herba	**Взамен ВФС 42-2371-94**

Собранная в период начала цветения высушенная трава многолетнего культивируемого травянистого растения эхинацеи пурпурной – *Echinacea purpurea* (L.) *Moench*., сем. астровых – *Asteraceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Смесь цельных или частично измельченных кусков стеблей, листьев, цветочных корзинок, цветков, бутонов, реже незрелых плодов. Стебли цилиндрические, ребристые, голые, диаметром до 1 см. Листья черешковые, продолговато-яйцевидные или ланцетные, остроконечные, неравнокрупнозубчатые, реже цельнокрайние, с 5 – 3 продольными жилками, жесткие, шероховатые от короткощетинистого опушения. Цветочные корзинки с выпуклым, полым, густоусаженным прицветниками цветоложем. Обертка блюдцевидная, трехрядная; листочки обертки черепитчато-расположенные, ланцетные, остроконечные, отогнутые, опушенные с внешней стороны, голые по краям. Прицветники узколанцетные, с шиловидным окончанием, превышающие по длине трубчатые цветки. Краевые цветки язычковые, длиной до 6 см, пестичные, бесплодные, с двух-, трехзубчатым отгибом, снаружи опушенным. Срединные цветки трубчатые, обоеполые, с пятизубчатым венчиком. Плод – семянка обратнопирамидальная, четырехгранная, к основанию суженная, с хохолком в виде короны с неравномерными зубчиками.

Цвет стеблей зеленый, иногда с малиновыми или пурпурными пятнами; листьев – зеленый; цветков – малиновый или пурпурный; плодов – зеленый

или зеленовато-коричневый. Запах слабый. Вкус водного извлечения слегка горьковатый.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении листа с поверхности видны клетки эпидермиса с извилистыми стенками. Устьица овальные, окружены 2 – 6 околоустьичными клетками (аномоцитный тип), расположены на обеих сторонах листовой пластинки, на нижней их больше. Над жилками и вдоль них вытянуты прямостенные клетки эпидермиса. По жилкам и по краю листа встречаются простые длинные одноклеточные волоски и простые 2–4- клеточные волоски со спавшейся конечной клеткой, часто опадающей; простые 1–4-клеточные волоски, иногда с заметным утолщением стенок; изредка встречаются железистые волоски, состоящие из 1–2-клеточной ножки и одноклеточной овальной головки, заполненной желтовато-бурым содержимым. Клетки у основания волосков расположены радиально и образуют розетку. Клетки эпидермиса язычкового и трубчатого цветков со слабоизвилистыми, над жилками – с прямыми стенками, устьица мелкие, овальные, погруженные, окружены 4 – 6 околоустьичными клетками (аномоцитный тип). Простые 2–3-клеточные волоски с острым концом расположены преимущественно по жилкам. Железки состоят из 10 – 12 выделительных клеток, расположенных в 2 ряда.

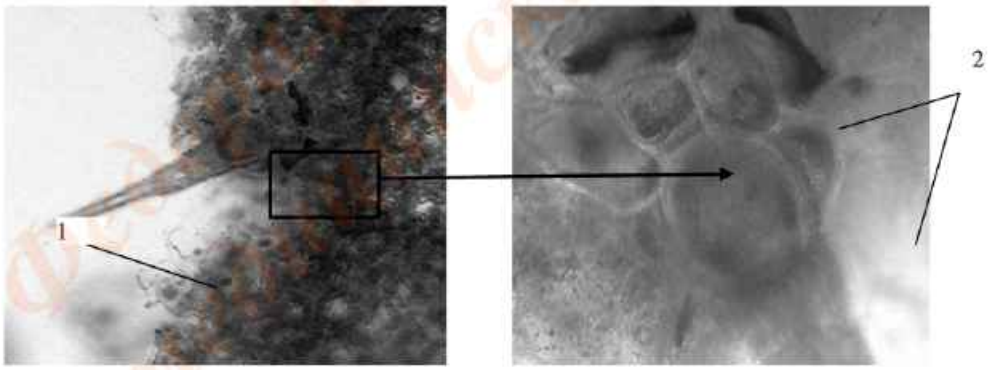


Рисунок 1 – Эхинацеи пурпурной трава.
Нижний эпидермис листа эхинацеи пурпурной. 1 – простой волосок (100×);
2 – клетки у основания волоска в виде розетки (400×).

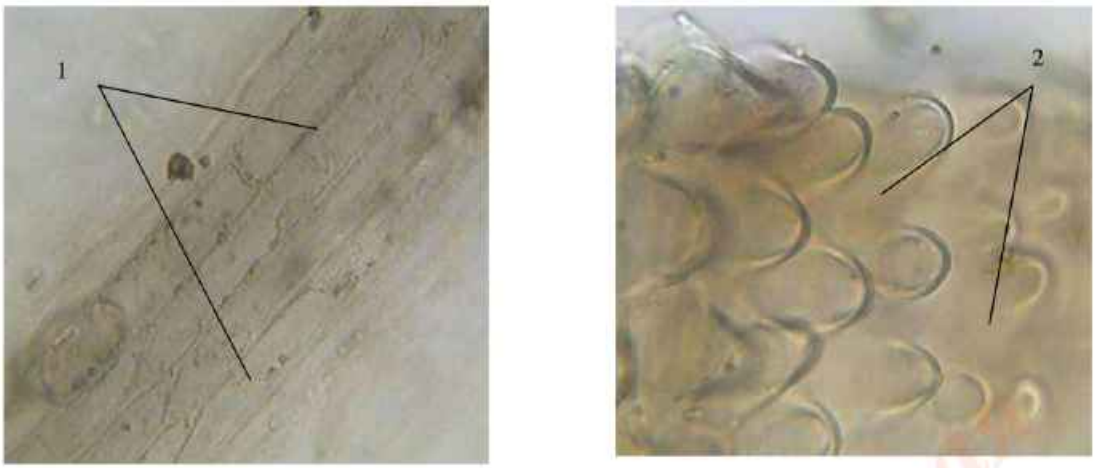


Рисунок 2 – Эхинацеи пурпурной трава.
Эпидермис язычкового цветка эхинацеи пурпурной (400×). 1 – клетки верхнего эпидермиса над жилкой; 2 – сосочковидные клетки нижнего эпидермиса.

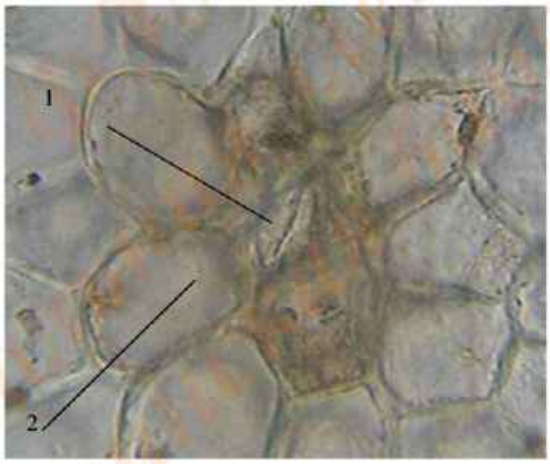


Рисунок 3 – Эхинацеи пурпурной трава.
Язычковый цветок эхинацеи пурпурной. Нижний эпидермис. Устьичный аппарат (400×). 1 – замыкающая клетка устьица; 2 – околоустьичная клетка.

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Раствор стандартного образца (СО) цикориевой кислоты. Около 0,025 г СО цикориевой кислоты растворяют в 15 – 20 мл спирта 70 % при

нагревании на водяной бане в мерной колбе вместимостью 25 мл, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают. Срок годности раствора 14 сут.

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором на алюминиевой подложке размером 10 × 15 см наносят 20 мкл испытуемого раствора (см. раздел «Количественное определение» раствор А), рядом наносят 20 мкл раствора СО цикориевой кислоты. Пластинку с нанесенными пробами сушат, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 1 ч смесью растворителей хлороформ – этанол – вода (26:16:3), 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 просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм.

На хроматограмме должна обнаруживаться темная зона адсорбции на уровне зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО цикориевой кислоты; допускается обнаружение других зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье* – не более 13 %.

Зола общая. *Цельное сырье* – не более 8 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье* – не более 4 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Части сырья, изменившие окраску. *Цельное сырье* – не более 3 %.

Другие части растения. *Цельное сырье* – не более 2 %.

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

Минеральная примесь. *Цельное сырье* – не более 1 %.

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:* сумма фенилпропаноидов в пересчете на цикориевую кислоту – не менее 2,5 %.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу с притертой пробкой вместимостью 25 мл, прибавляют 0,1 г щавелевой кислоты, вносят остеклованный магнитный стержень и приливают 10 мл спирта 95 %. Колбу с содержимым закрывают пробкой и взвешивают. Затем колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают до слабого кипения растворителя при постоянном перемешивании на магнитной мешалке в течение 45 мин. После охлаждения колбу вновь закрывают пробкой, взвешивают, доводят до первоначальной массы спиртом 95 % и перемешивают. Содержимое колбы переносят в центрифужную пробирку вместимостью 25 мл и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 3 мин.

На стартовую линию фильтровальной бумаги размером 15 × 15 см наносят в 2 повторностях полосой не более 3 см по 20 мкл надосадочной жидкости. После высыхания пятен их границы отмечают графитовым карандашом и хроматографируют восходящим методом в хлороформе. Когда фронт растворителя пройдет 5 см, бумагу вынимают из камеры и сушат на

воздухе до удаления запаха хлороформа. Отмеченные участки стартовых пятен вырезают, помещают в колбу со шлифом вместимостью 25 мл, приливают в каждую по 10 мл хористоводородной кислоты раствора 0,1 М и перемешивают на механическом встряхивателе в течение 30 мин.

Оптическую плотность полученных растворов измеряют на спектрофотометре при длине волны 328 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют хлористоводородной кислоты раствор 0,1 М.

Содержание сумма фенилпропаноидов в пересчете на цикориевую кислоту и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 10 \cdot 10 \cdot 10 \cdot 100 \cdot 100}{A_{\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 0{,}02 \cdot 1000 \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность полученных растворов;

$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения СО цикориевой кислоты при 328 нм, равный 782;

a – навеска сырья, г;

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».

Фармацевтическая электронная библиотека

Аллерген туберкулезный рекомбинантный в стандартном разведении	**ФС.3.3.1.0001.15** **Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на аллерген туберкулезный рекомбинантный, который представляет собой гибридный белок с молекулярной массой около 27 кДа, состоящий из 2 антигенов CFP10-ESAT6, продуцируемый генетически модифицированной культурой *Escherichia coli* BL21(DE3)/pCFP-ESAT.

Аллерген туберкулезный рекомбинантный предназначен для дифференциальной диагностики туберкулеза.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство препарата аллергена туберкулезного рекомбинантного должно осуществляться с соблюдением установленных правил организации производства и контроля качества генно-инженерных иммунобиологических лекарственных средств, гарантирующих качество и безопасность для человека.

Выращенную культуру клеток бактерий-продуцентов отделяют от среды и лизируют для высвобождения белка. Лизат клеток-продуцентов проходит стадии хроматографического выделения и очистки целевого белка-концентрата. Очищенный концентрат – полуфабрикат (субстанция) аллергена туберкулезного подлежит проверке на стерильность, отсутствие сенсибилизирующих свойств, содержание белка, специфичность, специфическую активность, аномальную токсичность. Стандартное разведение аллергена получают путем разведения концентрата

изотоническим фосфатным буферным раствором до содержания 0,2 мкг гибридного белка в 0,1 мл.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Бесцветная прозрачная жидкость без посторонних примесей.

Подлинность. Препарат при внутрикожном введении морским свинкам, зараженным тест-штаммом *Mycobacterium tuberculosis*, должен вызывать положительные кожные реакции, а у животных, иммунизированных вакциной БЦЖ, реакции должны отсутствовать (разделы «Специфическая активность», «Специфичность»).

Прозрачность. Должен быть прозрачным. Определение проводят визуально в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Цветность. Должен быть бесцветным. Определение проводят визуально в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

pH. От 7,35 до 7,55. Определяют потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Аномальная токсичность. Должен быть нетоксичным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность» на 5 мышах, тест-доза 0,5 мл.

Бактериальные эндотоксины. Не более 5 ЕЭ/мл. Определение проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

Стерильность. Должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методом прямого посева или мембранной фильтрации.

Специфическая активность. В 0,1 мл препарата должно содержаться 0,2 мкг аллергена туберкулезного рекомбинантного. Индекс специфической

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

активности должен быть равен (1,00 ± 0,05). Испытание проводят на морских свинках, зараженных живой культурой *Mycobacterium tuberculosis*.

Морских свинок (альбиносов или белокожих Hartley) массой (350±50) г содержат на постоянном пищевом рационе и в одинаковых условиях окружающей среды. Сенсибилизацию проводят путем заражения животных подкожно или аэрогенно вирулентным штаммом *M. tuberculosis*. Используют третью генерацию тест-штамма с плотной среды для выращивания микобактерий. Морских свинок используют для постановки проб не более 2 раз в период от 30 до 120 сут после инфицирования с интервалом между постановками проб не менее 30 сут. При повторном использовании животных пробы ставят на участках кожи, ранее не подвергавшихся воздействию препаратов.

За 24 ч до постановки туберкулиновых проб шерсть на спине или боках морских свинок удаляют сплошной полосой шириной 3–4 см.

Испытание препарата проводят на 6 зараженных микобактериями туберкулеза морских свинках. Заполняют 4 шприца испытуемым образцом и 4 шприца разведенным (0,2 мкг/0,1 мл) стандартным образцом (СО) аллергена туберкулезного рекомбинантного. Каждой морской свинке по методу случайных чисел вводят по 0,1 мл внутрикожно 4 пробы испытуемого образца и 4 пробы СО. Реакцию учитывают через 24 ч, измеряя 2 взаимно перпендикулярных диаметра эритемы в мм. Подсчитывают суммы реакций на испытуемый препарат и на СО. Специфическую активность оценивают по индексу специфической активности (I) – отношению суммы реакций на испытуемый препарат к сумме реакций на разведенный СО при отсутствии достоверных различий между средними реакциями на испытуемый препарат и СО. Если полученные результаты выходят за указанные пределы, испытание повторяют. Результаты 2 испытаний усредняют.

Специфичность. Морские свинки, иммунизированные вакциной БЦЖ, не должны реагировать на внутрикожное введение 0,2 мкг в 0,1 мл испытуемого аллергена туберкулезного рекомбинантного и давать

положительные реакции – папулы диаметром не менее 5 мм на 2 ТЕ в 0,1 мл СО очищенного туберкулина. Испытание проводят на 3 морских свинках не ранее чем через 30 дней после введения им по 0,5 мг вакцины БЦЖ.

Фенол. От 0,20 до 0,30 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение фенола спектрофотометрическим методом в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Производственные штаммы. Рекомбинантный штамм *Escherichia coli* BL21(DE3)/pCFP-ESAT – прототрофный штамм *E. coli* B (депонирован в ИБХ РАН), который обладает рядом характеристик, отличающих его от штамма предшественника: быстрый рост на минимальной среде, способность к синхронизации, устойчивый рост культуры в условиях биосинтеза белка и недостатка питательных веществ, дефектность системы рестрикции ДНК B-типа. Штамм несет оригинальную плазмиду pCFP10-ESAT6, содержащую генетическую конструкцию из 2 генов *M. tuberculosis – cfp10* и *esat 6* и ген устойчивости к ампициллину (*bla*). Штамм устойчив к ампициллину (100 – 150 мкг/мл) и чувствителен к остальным антибиотикам.

Для контроля качества препарата используют тест-штаммы *M.tuberculosis* (вирулентный) и *M. bovis* BCG - 1 из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование. При температуре от 2 до 8 °С в условиях, исключающих замораживание. Допускается транспортирование при температуре не выше 18 °С в течение 15 дней.

Хранение. При температуре от 2 до 8 °С. Не замораживать!

Анатоксин дифтерийно-столбнячный адсорбированный (АДС-анатоксин)	**ФС.3.3.1.0002.15** **Взамен ГФ X, ст. 61** **ФС 42- 3361-97**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на иммунобиологический лекарственный препарат - анатоксин дифтерийно-столбнячный адсорбированный (АДС-анатоксин), который представляет собой дифтерийный и столбнячный анатоксины, полученные из соответствующих экзотоксинов путем обезвреживания формальдегидом при нагревании, которые адсорбированы на алюминия гидроксиде или другом минеральном сорбенте, разрешенном к применению.

АДС-анатоксин предназначен для специфической профилактики дифтерии и столбняка.

ПРОИЗВОДСТВО

Все этапы производства АДС-анатоксина должны быть валидированы с целью подтверждения установленных требований и должны гарантировать безопасность его применения.

Столбнячный анатоксин

При производстве столбнячного анатоксина используют штаммы/штамм *Clostridium tetani*, полученные и депонированные в Государственной коллекции. Микробные клетки культивируют на жидких питательных средах, обеспечивающих высокую продукцию столбнячного токсина. Методы культивирования должны гарантировать сохранение свойств штаммов и предотвращать их контаминацию. Токсинсодержащую

Федеральная электронная медицинская библиотека

культуральную жидкость, освобожденную от микробных клеток и продуктов их распада, проверяют на стерильность, pH и содержание токсина.

Для производства столбнячного анатоксина используют культуральную среду с активностью токсина не менее 15 $L+/_{100}$ в 1 мл. Детоксикация столбнячного токсина должна обеспечивать сохранение антигенной активности анатоксина и гарантировать его безопасность: отсутствие остаточной токсичности (специфическая безопасность) и реверсии токсических свойств.

Определение специфической безопасности столбнячного анатоксина. Испытание проводят на 5 морских свинках массой тела 250–350 г, которым вводят подкожно 1500 Lf (суммарно в бок и внутреннюю поверхность верхней трети бедра) столбнячного анатоксина. В течение 21 сут наблюдения у животных не должны обнаруживаться признаки столбняка (ригидность лапки, искривление позвоночника или сочетание указанных признаков) и потери массы тела. Если установлена гибель более 1 животного по причине, не связанной со специфической интоксикацией, испытание повторяют. Если при повторном испытании фиксируют гибель более 1 животного, столбнячный анатоксин признают не прошедшим испытание.

Реверсия токсичности столбнячного анатоксина. Готовят раствор, содержащий столбнячный анатоксин, консервант (при его наличии) в 0,9 % растворе натрия хлорида в концентрации, принятой для готового продукта. Полученную смесь делят на 2 части и выдерживают в течение 42 сут: первую – при температуре (37 ± 1) °С, вторую – при температуре от 2 до 8 °С. Каждый образец вводят подкожно 5 морским свинкам с массой тела 250 – 350 г в объеме 5 мл (по 2,5 мл в оба бока). Наличие признаков столбняка в течение 21 сут наблюдения за животными свидетельствует о присутствии в пробе столбнячного токсина.

Для характеристики очищенного столбнячного анатоксина определяют его pH, специфическую (антигенную) активность, содержание общего и белкового азота, антигенную чистоту (удельную активность).

Столбнячный анатоксин должен быть очищен от примесей, вызывающих побочные реакции при введении человеку.

Для производства АДС-анатоксина используют только стерильный и безопасный столбнячный анатоксин с антигенной чистотой не менее 1000 ЕС (или Lf) на мг белкового азота.

Дифтерийный анатоксин

При производстве дифтерийного анатоксина используют токсигенный штамм *Corynebacterium diphtheriae*, полученный и депонированный в Государственной коллекции. Микробные клетки культивируют на жидких питательных средах, обеспечивающих высокую продукцию дифтерийного токсина. Методы культивирования должны гарантировать сохранение свойств штамма и предотвращать его контаминацию. Токсинсодержащую культуральную жидкость, освобожденную от микробных клеток и продуктов их распада, проверяют на стерильность, pH и содержание токсина.

Для производства дифтерийного анатоксина используют культуральную среду с активностью токсина не менее 80 Lf в 1 мл. Детоксикация дифтерийного токсина должна обеспечивать сохранение антигенной активности анатоксина и гарантировать его безопасность: отсутствие остаточной токсичности (специфическая безопасность) и реверсии токсических свойств.

Определение специфической безопасности дифтерийного анатоксина. Морским свинкам (5 животным) массой 250 – 350 г вводят подкожно 1500 Lf (суммарно в оба бока) дифтерийного анатоксина. В течение 42 сут наблюдения у животных не должны обнаруживаться изъязвления, инфильтраты, абсцессы, некрозы на местах инъекций и потеря массы тела. Если наблюдается гибель хотя бы 1 животного от дифтерийной

интоксикации (красные надпочечники при аутопсии погибших животных), дифтерийный анатоксин применению не подлежит. Если устанавливают гибель более 1 животного по причине, не связанной с дифтерийной интоксикацией, испытание повторяют. Если при повторном испытании фиксируют гибель более 1 животного, дифтерийный анатоксин считают не прошедшим испытание.

Реверсия токсичности дифтерийного анатоксина. Готовят раствор, содержащий дифтерийный анатоксин, консервант (при его наличии) в 0,9 % растворе натрия хлорида в концентрации, принятой для готового продукта. Полученную смесь делят на 2 части и выдерживают в течение 42 сут: первую – при температуре (37 ± 1) ºС, вторую – при температуре от 2 до 8 ºС. По 0,1 мл каждого образца вводят внутрикожно 2 морским свинкам массой 250 – 350 г или кролику массой (2,5 ± 0,5) кг в объеме 0,2 мл. Наличие реакций на месте инъекции в течение 4 сут наблюдения свидетельствует о присутствии во введенном растворе дифтерийного токсина.

Для характеристики очищенного дифтерийного анатоксина определяют его pH, специфическую (антигенную) активность, содержание общего и белкового азота, антигенную чистоту (удельную активность). Дифтерийный анатоксин должен быть очищен от примесей, вызывающих побочные реакции при введении человеку.

Для производства АДС-анатоксина используют только стерильный и безопасный дифтерийный анатоксин, содержащий не менее 1500 Lf на мг белкового азота.

Показатели, которые влияют на качество, но не могут быть определены в конечном продукте, должны быть проверены на промежуточных стадиях производства, что должно быть отражено в нормативной документации.

Прививочная доза (0,5 мл) содержит 30 Lf дифтерийного и 10 Lf/EC столбнячного анатоксинов. В состав лекарственного средства может входить консервант.

Фармацевтическая электронная библиотека

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Опалесцирующая жидкость белого цвета, которая может иметь сероватый или желтоватый оттенок. При отстаивании разделяется на рыхлый осадок белого или белого с сероватым или желтоватым оттенком цвета, легко диспергируемый при встряхивании, и прозрачную бесцветную надосадочную жидкость. Определяют визуально. Наблюдение проводят в проходящем свете.

Подлинность. Должен обладать специфической (иммуногенной) активностью, обеспечивая защиту от действия дифтерийного и столбнячного токсинов. Определение проводят в соответствии с разделом «Специфическая активность». Могут быть использованы альтернативные методы, подтверждающие наличие в лекарственном препарате дифтерийного и столбнячного анатоксинов, обладающих антигенной активностью.

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH. От 6,4 до 7,3, если нет других указаний в нормативной документации. Испытания проводят потенциометрическим методом с неразведенным АДС-анатоксином в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Размер частиц (дисперсность). Должен свободно проходить в шприц через иглу № 0840, если нет других указаний в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Инъекционные лекарственные формы. Лекарственные средства для парентерального применения».

Время седиментационной устойчивости. После встряхивания и получения гомогенной взвеси не должно наблюдаться полного расслаивания в течение не менее 1 мин, если нет других указаний в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Инъекционные лекарственные формы. Лекарственные средства для парентерального применения».

Стерильность. Должен быть стерильным. Испытания проводят методами прямого посева или мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность». Для контроля используют тиогликолевую среду. Посевы инкубируют при температуре 30 – 35 и 20 – 25 ºС.

Аномальная токсичность. Должен быть нетоксичным. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Белым мышам массой 16 – 18 г препарат вводят внутрибрюшинно по 1 мл, морским свинкам – подкожно по 5 мл (по 2,5 мл в оба бока). За животными наблюдают 7 сут. В течение указанного времени не должны наблюдаться гибель животных и потеря массы тела.

Специфическая безопасность. Должен быть безопасным при подкожном введении 5 морским свинкам массой 250–350 г 10 прививочных доз для человека (по 5 доз в бок и лапку). Через 30 дней все животные должны остаться живыми без симптомов столбняка и потери массы тела. Если животное погибло от дифтерийной интоксикации (алая окраска и увеличение надпочечников при аутопсии погибших животных), препарат признается непригодным к применению. Если гибель животного или потеря массы тела произошла по причине, не связанной со специфической интоксикацией, испытание повторяют. Если при повторном испытании наблюдается гибель животных, лекарственный препарат не соответствует требованиям.

Специфическая (иммуногенная) активность. Специфическая активность прививочной дозы (0,5 мл) должна быть не ниже 30 МЕ для дифтерийного компонента и не ниже 40 МЕ для столбнячного компонента. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Иммуногенность адсорбированного дифтерийного анатоксина» и ОФС «Иммуногенность адсорбированного столбнячного анатоксина».

Полнота сорбции. В 1 мл надосадочной жидкости содержание неадсорбированного дифтерийного анатоксина не должно превышать 1 Lf,

неадсорбированного столбнячного анатоксина – 0,1 ЕС, если нет других указаний в нормативной документации.

Определение содержания неадсорбированного дифтерийного анатоксина в надосадочной жидкости проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания анатоксинов/токсинов в реакции флокуляции», неадсорбированного столбнячного анатоксина – в соответствии с ОФС «Определение содержания анатоксинов/токсинов в реакции антитоксинсвязывания», если нет других указаний в нормативной документации.

Формальдегид. Не более 100 мкг/мл. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение формальдегида в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Производственные штаммы микроорганизмов. Раздел должен содержать следующую информацию: наименование штаммов; место их депонирования; допустимое количество пассажей (при необходимости) и методику их проведения с указанием условий культивирования; при необходимости – дополнительные к паспортным данным требования к характеристикам штаммов.

Консерванты. Концентрация консерванта не должна быть ниже минимально эффективной и не должна превышать указанную на упаковке более чем на 15 %. В качестве консерванта используют тиомерсал. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение тиомерсала в иммунобиологических лекарственных препаратах». Не рекомендуется использование консервантов при производстве лекарственных препаратов, выпускаемых в однодозовой расфасовке.

Сорбенты. Алюминия гидроксид. Не более 1,1 мг/мл алюминия(III), если в нормативной документации нет иных указаний. Определение проводят комплексонометрическим методом в соответствии с ОФС

«Определение ионов алюминия в сорбированных иммунобиологических лекарственных препаратах».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты». На первичную упаковку наносят дополнительное указание «Встряхивать!». На вторичную упаковку наносят дополнительные указания «Перед употреблением встряхивать», «Замораживание не допускается».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Анатоксин дифтерийно-столбнячный адсорбированный с уменьшенным содержанием антигенов (АДС-М-анатоксин) **ФС.3.3.1.0003.15**

Взамен ФС 42 -3358 - 97

Настоящая фармакопейная статья распространяется на иммунобиологический лекарственный препарат - анатоксин дифтерийно-столбнячный адсорбированный с уменьшенным содержанием антигенов (АДС-М-анатоксин), который представляет собой дифтерийный и столбнячный анатоксины, полученные из соответствующих экзотоксинов путем обезвреживания формальдегидом при нагревании; анатоксины очищены и адсорбированы на алюминия гидроксиде или другом разрешенном к применению минеральном сорбенте.

АДС-М-анатоксин предназначен для специфической профилактики дифтерии и столбняка.

ПРОИЗВОДСТВО

Все этапы производства АДС-М-анатоксина должны быть валидированы с целью подтверждения установленных требований и должны гарантировать безопасность его применения.

Столбнячный анатоксин

При производстве столбнячного анатоксина используют штаммы/штамм *Clostridium tetani*, полученные и депонированные в Государственной коллекции. Микробные клетки культивируют на жидких питательных средах, обеспечивающих высокую продукцию столбнячного токсина. Методы культивирования должны гарантировать сохранение

свойств штаммов и предотвращать их контаминацию. Токсинсодержащую культуральную жидкость, освобожденную от микробных клеток и продуктов их распада, проверяют на стерильность, pH и содержание токсина.

Для производства столбнячного анатоксина используют культуральную среду с активностью токсина не менее 15 $L+/_{100}$ в 1 мл. Детоксикация столбнячного токсина должна обеспечивать сохранение антигенной активности анатоксина и гарантировать его безопасность: отсутствие остаточной токсичности (специфическая безопасность) и реверсии токсических свойств.

Определение специфической безопасности столбнячного анатоксина. Испытание проводят на 5 морских свинках массой 250–350 г, которым вводят подкожно 1500 Lf (суммарно в бок и внутреннюю поверхность верхней трети бедра) столбнячного анатоксина. В течение 21 сут наблюдения у животных не должны обнаруживаться признаки столбняка (ригидность лапки, искривление позвоночника или сочетание указанных признаков) и потери массы тела. Если более 1 животного гибнут по причине, не связанной со специфической интоксикацией, испытание повторяют. Если при повторном испытании наблюдают гибель более 1 животного, столбнячный анатоксин испытание не проходит.

Реверсия токсичности столбнячного анатоксина. Готовят раствор, содержащий столбнячный анатоксин, консервант (при его наличии) в 0,9 % растворе натрия хлорида в концентрации, принятой для готового продукта. Полученную смесь делят на 2 части и выдерживают в течение 42 сут: первую – при температуре (37 ± 1) °С, вторую – при температуре от 2 до 8 °С. Каждый образец вводят подкожно 5 морским свинкам массой 250 – 350 г в объеме 5 мл (по 2,5 мл в оба бока). Наличие признаков столбняка в течение 21 сут наблюдения за животными свидетельствует о присутствии в пробе столбнячного токсина.

Для характеристики очищенного столбнячного анатоксина определяют его pH, специфическую (антигенную) активность, содержание общего и белкового азота, антигенную чистоту (удельную активность).

Столбнячный анатоксин должен быть очищен от примесей, вызывающих побочные реакции при введении человеку.

Для производства АДС-М-анатоксина используют только стерильный и безопасный столбнячный анатоксин с антигенной чистотой не менее 1000 ЕС (или Lf) на мг белкового азота.

Дифтерийный анатоксин

При производстве дифтерийного анатоксина используют токсигенный штамм *Corynebacterium diphtheriae*, полученный и депонированный в Государственной коллекции. Микробные клетки культивируют на жидких питательных средах, обеспечивающих высокую продукцию дифтерийного токсина. Методы культивирования должны гарантировать сохранение свойств штамма и предотвращать его контаминацию. Токсинсодержащую культуральную жидкость, освобожденную от микробных клеток и продуктов их распада, проверяют на стерильность, pH и содержание токсина. Для производства дифтерийного анатоксина используют культуральную среду с активностью токсина не менее 80 Lf в 1 мл. Детоксикация дифтерийного токсина должна обеспечивать сохранение антигенной активности анатоксина и гарантировать его безопасность: отсутствие остаточной токсичности (специфическая безопасность) и реверсии токсических свойств.

Определение специфической безопасности дифтерийного анатоксина. Испытание проводят на 5 морских свинках массой 250 – 350 г, которым вводят подкожно 1500 Lf (суммарно в оба бока) дифтерийного анатоксина. В течение 42 сут наблюдения у животных не должны обнаруживаться изъязвления, инфильтраты, абсцессы, некрозы на местах инъекции и потеря массы тела. Если наблюдается гибель хотя бы 1 животного от дифтерийной интоксикации (красные надпочечники при

аутопсии погибших животных), дифтерийный анатоксин применению не подлежит. Если установлена гибель более 1 животного по причине, не связанной с дифтерийной интоксикацией, испытание повторяют. Если при повторном испытании наблюдается гибель более 1 животного, дифтерийный анатоксин считают не прошедшим испытание.

Реверсия токсичности дифтерийного анатоксина. Готовят раствор, содержащий дифтерийный анатоксин и консервант (при его наличии) в 0,9 % растворе натрия хлорида в концентрации, принятой для готового продукта. Полученную смесь делят на 2 части и выдерживают в течение 42 сут: первую – при температуре (37 ± 1) ºС, вторую – при температуре от 2 до 8 ºС. По 0,1 мл каждого образца вводят внутрикожно 2 морским свинкам массой 250 – 350 г или кролику массой (2,5 ± 0,5) кг в объеме 0,2 мл. Наличие реакций на месте инъекции в течение 4 сут наблюдения свидетельствует о присутствии во введенном растворе дифтерийного токсина.

Для характеристики очищенного дифтерийного анатоксина определяют его pH, специфическую (антигенную) активность, содержание общего и белкового азота, антигенную чистоту (удельную активность). Дифтерийный анатоксин должен быть очищен от примесей, вызывающих побочные реакции при введении человеку.

Для производства АДС-М-анатоксина используют только стерильный и безопасный дифтерийный анатоксин, содержащий не менее 1500 Lf на мг белкового азота.

Показатели, которые влияют на качество, но не могут быть определены в конечном продукте, должны быть проверены на промежуточных стадиях производства, что должно быть отражено в нормативной документации производителя.

Прививочная доза АДС-М-анатоксина (0,5 мл) содержит 5 Lf дифтерийного и 5 Lf/ЕС столбнячного анатоксинов. В состав лекарственного средства может входить консервант.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Опалесцирующая жидкость белого цвета, которая может иметь сероватый или желтоватый оттенок. При отстаивании разделяется на рыхлый осадок белого или белого с сероватым или желтоватым оттенком цвета, легко диспергирующийся при встряхивании, и прозрачную бесцветную надосадочную жидкость. Испытания проводят визуально в проходящем свете.

Подлинность. Должен обладать специфической (иммуногенной) активностью, обеспечивая защиту от действия дифтерийного и столбнячного токсинов (раздел «Специфическая активность»). Могут быть использованы альтернативные методы, подтверждающие наличие в лекарственном средстве дифтерийного и столбнячного анатоксинов, обладающих антигенной активностью.

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH. От 6,4 до 7,3, если нет других указаний в нормативной документации. Испытания проводят потенциометрическим методом с неразведенным АДС-М-анатоксином в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Размер частиц (дисперсность). Препарат АДС-М-анатоксина должен свободно проходить в шприц через иглу № 0840, если нет других указаний в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Инъекционные лекарственные формы. Лекарственные средства для парентерального применения».

Время седиментационной устойчивости. После встряхивания и получения гомогенной взвеси не должно наблюдаться полного расслаивания в течение не менее 1 мин, если нет других указаний в нормативной документации производителя. Определение проводят в соответствии с ОФС

«Инъекционные лекарственные формы. Лекарственные средства для парентерального применения».

Стерильность. Должен быть стерильным. Испытания проводят методами прямого посева или мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность». Для посева используют тиогликолевую среду. Посевы инкубируют при температуре 30–35 и 20–25 °С.

Аномальная токсичность. Должен быть нетоксичным. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Белым мышам массой 16 – 18 г препарат вводят внутрибрюшинно по 1 мл, морским свинкам – подкожно по 5 мл (по 2,5 мл в оба бока). За животными наблюдают 7 сут. В течение указанного времени не должны наблюдаться гибель животных и потеря массы тела.

Специфическая безопасность. Должен быть безопасным при подкожном введении 5 морским свинкам массой 250 – 350 г 10 прививочных доз для человека (по 5 доз в бок и бедро). Через 30 дней все животные должны остаться живыми, без симптомов столбняка и потери массы тела. В случае гибели 1 животного или потери массы тела хотя бы 1 из животных от неспецифических причин испытание повторяют. Если при повторном испытании наблюдают гибель более 1 животного, препарат считают не соответствующим требованиям.

Специфическая (иммуногенная) активность. Должен обладать иммуногенной активностью, обеспечивая выживаемость 100 % иммунизированных животных при заражении летальной дозой дифтерийного токсина и не менее 70 % иммунизированных животных при заражении летальной дозой столбнячного токсина.

Материалы и животные:

– дифтерийный токсин с предварительно установленной величиной Dlm (минимальная доза токсина, вызывающая гибель животных в течение 4 сут);

– столбнячный токсин с предварительно установленной величиной Dlm;

– морские свинки массой 250 – 350 г;

– мыши белые беспородные массой 14–16 г.

Испытание иммуногенности дифтерийного компонента. Неразведенный препарат вводят 4 морским свинкам массой 250–350 г однократно под кожу бока в дозе 0,6 мл, что соответствует (6,0 ± 0,3) Lf дифтерийного анатоксина. Через 30 сут определяют резистентность иммунизированных свинок к дифтерийному токсину, который вводят животным в дозе не менее 100 Dlm подкожно в бок в объеме 1 мл. За животными наблюдают 4 сут, в течение которых все морские свинки должны остаться живыми. Испытание сопровождают контролем 1 Dlm дифтерийного токсина на 3 морских свинках из той же партии. Контрольные животные (не менее 2) должны погибнуть в течение 4 сут.

Испытание иммуногенности столбнячного компонента. Препарат разводят стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида до 4 ЕС/мл и вводят группе из 10 белых мышей массой 16 – 18 г подкожно в область внутренней поверхности верхней трети бедра в дозе (2,0±0,1) ЕС в объеме 0,5 мл. Через 21 сут определяют резистентность иммунизированных мышей к столбнячному токсину, который вводят животным в дозе не менее 50 Dlm под кожу внутренней поверхности верхней трети бедра в объеме 0,5 мл. За животными наблюдают в течение 4 сут. Препарат считают выдержавшим испытание, если не менее 7 мышей останутся живыми без явлений столбняка. Опыт сопровождают контролем 1 Dlm столбнячного токсина на 4 мышах из той же партии. Контрольные животные (не менее 2) должны погибнуть в течение 4 сут.

Полнота сорбции. В 1 мл надосадочной жидкости содержание неадсорбированного дифтерийного анатоксина не должно превышать 1 Lf,

неадсорбированного столбнячного анатоксина – 0,1 ЕС, если нет других указаний в нормативной документации производителя.

Полноту сорбции определяют путем индикации неадсорбированных дифтерийного и столбнячного анатоксинов в надосадочной жидкости АДС-М-анатоксина. Определение содержания неадсорбированного дифтерийного анатоксина в надосадочной жидкости проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания анатоксинов/токсинов в реакции флокуляции», неадсорбированного столбнячного анатоксина – в соответствии с ОФС «Определение содержания анатоксинов/токсинов в реакции антитоксинсвязывания», если нет других указаний в нормативной документации.

Формальдегид. Не более 100 мкг/мл. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение формальдегида в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Производственные штаммы микроорганизмов. Раздел должен содержать следующую информацию: наименование штаммов; место их депонирования; допустимое количество пассажей (при необходимости) и методику их проведения с указанием условий культивирования; при необходимости – дополнительные к паспортным данным требования к характеристикам штаммов.

Консерванты. Тиомерсал. Концентрация консерванта не должна быть ниже минимально эффективной и не должна превышать указанную на упаковке более чем на 15%. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение тиомерсала в иммунобиологических лекарственных препаратах». Не рекомендуется использование консервантов при производстве лекарственных препаратов, выпускаемых в однодозовой расфасовке.

Сорбенты. Алюминия гидроксид. Не более 1,1 мг/мл алюминия(III), если в нормативной документации нет иных указаний. Определение

проводят комплексонометрическим методом в соответствии с ОФС «Определение ионов алюминия в сорбированных иммунобиологических лекарственных препаратах».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты». На первичную упаковку наносят дополнительное указание «Встряхивать!». На вторичную упаковку наносят дополнительные указания «Перед употреблением встряхивать», «Замораживание не допускается».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Анатоксин дифтерийный адсорбированный с уменьшенным содержанием антигена (АД-М-анатоксин) **ФС.3.3.1.0004.15**

Взамен ФС 42-3360-97

Настоящая фармакопейная статья распространяется на иммунобиологический лекарственный препарат анатоксин дифтерийный адсорбированный с уменьшенным содержанием антигена (АД-М-анатоксин), который представляет собой дифтерийный анатоксин, полученный из дифтерийного экзотоксина путем обезвреживания формальдегидом при нагревании, очищенный и адсорбированный на алюминия гидроксиде или другом разрешенном к применению минеральном сорбенте. АД-М-анатоксин предназначен для специфической профилактики дифтерии.

ПРОИЗВОДСТВО

Все этапы производства АД-М-анатоксина должны быть валидированы с целью подтверждения установленных требований и должны гарантировать безопасность его применения.

Дифтерийный анатоксин представляет собой токсин *Corynebacterium diphtheriae*, обезвреженный и очищенный способом, гарантирующим полную стабильную детоксикацию при сохранении антигенной активности. Для получения дифтерийного токсина используют токсигенный штамм *Corynebacterium diphtheriae*, полученный и депонированный в Государственной коллекции. Микробные клетки культивируют на жидких питательных средах, обеспечивающих высокую продукцию дифтерийного токсина. Методы культивирования должны гарантировать сохранение

свойств штамма и предотвращать его контаминацию. Токсинсодержащую культуральную жидкость, освобожденную от микробных клеток и продуктов их распада, проверяют на стерильность, pH и содержание токсина. Для производства дифтерийного анатоксина используют культуральную среду с активностью токсина не менее 80 Lf в 1 мл. Детоксикация дифтерийного токсина и очистка дифтерийного анатоксина (кислотно-солевое осаждение, мембранная фильтрация) должны обеспечивать сохранение антигенной активности анатоксина и гарантировать его безопасность: отсутствие остаточной токсичности (специфическая безопасность) и реверсии токсических свойств.

Определение специфической безопасности дифтерийного анатоксина. Испытание проводят на 5 морских свинках массой 250 – 350 г, которым вводят подкожно 1500 Lf (суммарно в оба бока) дифтерийного анатоксина. В течение 42 сут наблюдения у животных не должны обнаруживаться изъязвления, инфильтраты, абсцессы, некрозы на местах инъекции и потеря массы тела. Если наблюдается гибель хотя бы 1 животного от дифтерийной интоксикации (красные надпочечники при аутопсии погибших животных), дифтерийный анатоксин применению не подлежит. Если фиксируют гибель более 1 животного по причине, не связанной с дифтерийной интоксикацией, испытание повторяют. Если при повторном испытании наблюдается гибель более 1 животного, дифтерийный анатоксин считают не прошедшим испытание.

Реверсия токсичности дифтерийного анатоксина. Готовят раствор, содержащий дифтерийный анатоксин и консервант (при его наличии) в 0,9 % растворе натрия хлорида в концентрации, принятой для готового продукта. Полученную смесь делят на 2 части и выдерживают в течение 42 сут первую – при температуре (37 ± 1) °С, вторую – при температуре от 2 до 8 °С. По 0,1 мл каждого образца препарата вводят внутрикожно 2 морским свинкам массой 250 – 350 г или 1 кролику массой (2,5 ± 0,5) кг в объеме 0,2 мл.

Наличие реакций на месте инъекции в течение 4 сут наблюдения свидетельствует о присутствии во введенном растворе дифтерийного токсина.

Для характеристики очищенного дифтерийного анатоксина определяют его pH, специфическую (антигенную) активность, содержание общего и белкового азота, антигенную чистоту (удельную активность). Дифтерийный анатоксин должен быть очищен от примесей, вызывающих побочные реакции при введении человеку.

Для производства АД-М-анатоксина можно использовать только стерильный и безопасный дифтерийный анатоксин с активностью не менее 1500 Lf на мг белкового азота.

Показатели, которые влияют на качество, но не могут быть определены в конечном продукте, должны быть проверены на промежуточных стадиях производства, что должно быть отражено в нормативной документации.

Прививочная доза (0,5 мл) содержит 5 Lf дифтерийного анатоксина. В состав лекарственного средства может входить антимикробный консервант.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Опалесцирующая жидкость белого цвета, которая может иметь сероватый или желтоватый оттенок. При отстаивании разделяется на рыхлый осадок белого или белого с сероватым или желтоватым оттенком цвета, легко диспергирующийся при встряхивании, и прозрачную бесцветную надосадочную жидкость. Испытания проводят визуально в проходящем свете.

Подлинность. Должен обладать специфической (иммуногенной) активностью, обеспечивая защиту от действия дифтерийного токсина (раздел «Специфическая активность»). В нормативной документации могут быть указаны альтернативные методы, подтверждающие наличие в лекарственном средстве дифтерийного анатоксина, обладающего антигенной активностью.

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH. От 6,4 до 7,3, если нет других указаний в нормативной документации. Испытание проводят потенциометрическим методом с неразведенным АД-М-анатоксином в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Размер частиц (дисперсность). Препарат АД-М-анатоксина должен свободно проходить в шприц через иглу № 0840, если нет других указаний в нормативной документации производителя. Определение проводят в соответствии с ОФС «Инъекционные лекарственные формы. Лекарственные средства для парентерального применения».

Время седиментационной устойчивости. После встряхивания и получения гомогенной взвеси не должно наблюдаться полного расслаивания в течение не менее 1 мин, если нет других указаний в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Инъекционные лекарственные формы. Лекарственные средства для парентерального применения».

Стерильность. Должен быть стерильным. Испытания проводят методами прямого посева или мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность». Для контроля используют тиогликолевую среду. Посевы инкубируют при температуре 30 – 35 °С и 20 – 25 °С.

Аномальная токсичность. Должен быть нетоксичным. Контроль проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Белым мышам препарат вводят внутрибрюшинно по 1 мл, морским свинкам – подкожно по 5 мл (по 2,5 мл в оба бока). За животными наблюдают 7 сут. В течение указанного времени не должно быть гибели животных и потери массы тела.

Специфическая безопасность. Должен быть безопасным при подкожном введении 5 морским свинкам массой 250 – 350 г 10 прививочных

доз для человека (по 2,5 мл в оба бока). Через 30 дней все животные должны остаться живыми без потери массы тела. При гибели 1 из животных опытной группы производят его вскрытие и оценку состояния надпочечников (алая окраска надпочечников является признаком дифтерийной интоксикации). Если животное погибло от дифтерийной интоксикации, препарат непригоден к применению. Если гибель животного или потеря массы тела произошла по причине, не связанной со специфической интоксикацией, испытание повторяют. Если при повторном испытании наблюдается гибель животных, лекарственный препарат признают не соответствующим требованиям.

Специфическая (иммуногенная) активность. Должен обладать иммуногенной активностью. Показатель выживаемости иммунизированных животных должен быть не менее 100 % при заражении летальной дозой дифтерийного токсина.

Материалы и животные:

- испытуемый образец лекарственного средства;

- дифтерийный токсин с предварительно установленной величиной Dlm (минимальная доза токсина, вызывающая гибель животных в течение 4 сут);

- морские свинки массой 250 – 350 г.

Проведение испытания. Неразведенный АД-М-анатоксин вводят 4 морским свинкам массой 250 – 350 г однократно под кожу бока в дозе 0,6 мл. Через 30 сут определяют резистентность иммунизированных свинок к дифтерийному токсину, который вводят животным в дозе не менее 100 Dlm подкожно в бок в объеме 1 мл. За животными наблюдают 4 сут, в течение которых все морские свинки должны остаться живыми. Испытание сопровождают контролем 1 Dlm дифтерийного токсина на 3 морских свинках из той же партии. Контрольные животные (не менее 2 из 3) должны погибнуть в течение 4 сут.

Полнота сорбции. В 1 мл надосадочной жидкости содержание неадсорбированного дифтерийного анатоксина не должно превышать 1 Lf, если нет других указаний в нормативной документации.

Полноту сорбции определяют путем индикации неадсорбированного дифтерийного анатоксина в надосадочной жидкости препарата АД-М-анатоксин. Определение содержания неадсорбированного дифтерийного анатоксина в надосадочной жидкости проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания анатоксинов/токсинов в реакции флокуляции», если нет других указаний в нормативной документации.

Формальдегид. Не более 100 мкг/мл. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение формальдегида в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Производственные штаммы микроорганизмов. Раздел должен содержать следующую информацию: наименование штаммов; место их депонирования; допустимое количество пассажей (при необходимости) и методику их проведения с указанием условий культивирования; при необходимости – дополнительные к паспортным данным требования к характеристикам штаммов.

Консерванты. Тиомерсал, если нет других указаний в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение тиомерсала в иммунобиологических лекарственных препаратах». Концентрация консерванта не должна быть ниже минимально эффективной и не должна превышать указанную на упаковке более чем на 15 %. Не рекомендуется использование консервантов при производстве лекарственных препаратов, выпускаемых в однодозовой расфасовке.

Сорбенты. Алюминия гидроксид. Не более 1,1 мг/мл алюминия (III), если в нормативной документации нет иных указаний. Определение проводят комплексонометрическим методом в соответствии с ОФС

«Определение ионов алюминия в сорбированных иммунобиологических лекарственных препаратах».

Могут использоваться и другие адсорбенты, эффективность и безопасность которых при соответствующем пути введения установлена.

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты». На первичную упаковку наносят дополнительное указание «Встряхивать!». На вторичную упаковку наносят дополнительные указания «Перед употреблением встряхивать», «Замораживание не допускается».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Анатоксин стафилококковый очищенный адсорбированный, суспензия для подкожного введения	**ФС.3.3.1.0005.15** **Взамен ГФ X, ст.63** **ФС 42 – 3111-95**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на анатоксин стафилококковый очищенный адсорбированный, суспензия для подкожного введения, который представляет собой токсин стафилококковый, обезвреженный формалином при нагревании, очищенный от балластных белков способом, гарантирующим полную детоксикацию и отсутствие возможности реверсии токсичности при сохранении антигенной и иммуногенной активности, адсорбированный на гидроксиде алюминия или другом разрешенном к применению минеральном адсорбенте.

При подкожном введении анатоксин стафилококковый очищенный адсорбированный вызывает образование специфических антител (антитоксинов) к экзотоксину стафилококковому.

Область применения:

- профилактика стафилококковых инфекций у лиц с повышенным риском заболевания (промышленные и сельскохозяйственные рабочие, подвергающиеся по роду своей деятельности частому травматизму), а также у больных, которым предстоят плановые операции;

- иммунизация доноров с целью получения антистафилококковой плазмы и изготовления антистафилококкового иммуноглобулина.

ПРОИЗВОДСТВО

При производстве анатоксина стафилококкового очищенного используют штамм *Staphylococcus aureus* О15 (или другой штамм стафилококка, обладающий аналогичными свойствами), который депонирован в официальной коллекции, происхождение и история которого документированы.

При культивировании на жидких питательных средах штамм должен образовывать экзотоксин (синонимы: токсин стафилококковый, альфатоксин, альфастафилолизин). Метод культивирования должен обеспечивать высокую продукцию токсина, сохранять гемолитические свойства штамма и исключать контаминацию штамма посторонней микрофлорой. Токсинсодержащая культуральная жидкость, освобожденная от микробных клеток и продуктов их распада, должна содержать токсин стафилококковый с гемолитической активностью не менее 500 DHM (минимальная гемолитическая доза) и иметь Lh (лимит гемолитического действия) токсина не более 0,4 мл. Способ детоксикации токсина стафилококкового должен гарантировать отсутствие токсичности и возможность ее реверсии при сохранении антигенной (не менее 2 ЕС/мл) и иммуногенной (способность вызывать образование специфических антител) активности анатоксина стафилококкового. Последующая концентрация должна обеспечить содержание в 1 мл концентрата не менее 30 ЕС (единиц связывания).

Для производства анатоксина стафилококкового адсорбированного проводят сорбцию полученного концентрированного анатоксина, добавляя необходимое (расчётное) количество гидроксида алюминия. Сорбция должна быть полной.

Для характеристики анатоксина стафилококкового очищенного адсорбированного, суспензии для подкожного введения, определяют: pH, время седиментационной устойчивости, размер частиц, дисперсность, стерильность, аномальную токсичность, специфическую безвредность, специфическую активность, полноту сорбции, содержание формальдегида, адсорбента и консерванта.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Суспензия белого цвета с желтоватым оттенком, разделяющаяся при стоянии на прозрачную надосадочную жидкость и рыхлый осадок, полностью диспергируемый при встряхивании. Определение проводят визуально.

Подлинность. Должен вызывать образование антител к токсину стафилококковому. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания антиальфастафилолизина (специфических антител) в препаратах крови человека и животных».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Нормативные требования указывают в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

pH. От 6,2 до 7,4 (если нет других указаний в нормативной документации). Определение проводят потенциометрически с неразведенным препаратом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Время седиментационной устойчивости. После встряхивания не должно наблюдаться расслаивания в течение 2,5 мин.

Размер частиц. Должен свободно проходить в шприц через иглу № 0840. Определение проводят в соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

Дисперсность. Показатель дисперсности от 0,6 до 1,4. Определение проводят фотометрически при разведении препарата 1:1 0,9 % раствором натрия хлорида в соответствии с указаниями в нормативной документации.

Стерильность. Препарат должен быть стерильным. Определение проводят методом прямого посева в соответствии с ОФС «Стерильность».

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичным.

Белым мышам (5 животным) массой тела 18–20 г препарат вводят внутрибрюшинно по 0,5 мл, 2 морским свинкам массой 250–300 г – подкожно по 2 мл.

Препарат считают выдержавшим испытание, если:

- в течение 7 сут наблюдения все животные остались живы и ни у одного из животных не были выявлены видимые признаки заболевания;

- ни у одного из животных не отмечена потеря массы тела;

- ни у одной морской свинки в месте введения препарата не развился абсцесс или некроз.

Если в течение периода наблюдения регистрируют гибель хотя бы 1 животного, заболевание, уменьшение массы тела или повреждение в месте инъекции, испытание повторяют на удвоенном количестве животных при тех же условиях учета опыта. Повторное испытание считают удовлетворительным, если препарат отвечает вышеперечисленным требованиям.

Специфическая безвредность. Препарат должен быть безвредным.

Кролику массой 2 – 2,5 кг препарат вводят подкожно по 2,5 мл в оба бока. Препарат считают выдержавшим испытание, если в течение 5 сут наблюдения кролик остаётся здоровым, и в местах введения препарата отсутствуют явления некроза тканей.

Специфическая активность (иммуногенность). Должен вызывать образование специфических антител при подкожном введении (содержание антиальфастафилолизина (специфических антител)) в сыворотках крови иммунизированных кроликов должно быть не менее 3 МЕ в 1 мл (среднеарифметическое значение).

Кроликам (3 животным) массой (2,0 ± 0,5) кг препарат вводят в объеме 0,5 мл подкожно двукратно с интервалом 17 – 20 сут. Через 8 – 10 сут после последней иммунизации у кроликов берут кровь из краевой вены уха и определяют в сыворотке крови каждого иммунизированного животного содержание антиальфастафилолизина. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение антиальфастафилолизина (специфических антител) в лекарственных препаратах из сыворотки крови человека и животных».

Примечание.

Для проведения испытаний по показателям «Специфическая безвредность» и «Специфическая активность (иммуногенность)» используют кроликов, у которых содержится не более 0,125 МЕ антиальфастафилолизина в 1 мл сыворотки крови. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания антиальфастафилолизина (специфических антител) в лекарственных препаратах из сыворотки крови человека и животных».

Полнота сорбции. Сорбция стафилококкового анатоксина должна быть полной. Надосадочная жидкость не должна содержать свободного стафилококкового анатоксина. Допускается наличие в 1 мл надосадочной жидкости не более 0,2 ЕС антиальфастафилолизина (1 ЕС представляет собой минимальное количество анатоксина, которое связывает 1 МЕ (Международная единица) антиальфастафилолизина).

Для постановки реакции используют следующие ингредиенты:

– испытуемый анатоксин стафилококковый;

– стандартный образец (СО) антиальфастафилолизина с установленным содержанием стафилококковых антител (МЕ/мл);

– токсин стафилококковый, гемолитические свойства которого характеризуются величиной Lh (лимит гемолитического действия – минимальное количество токсина стафилококкового, которое, будучи связано с 1 МЕ антиальфастафилолизина, вызывает почти полный (+++) гемолиз эритроцитов кролика);

– 15 % взвесь эритроцитов кролика;

– 0,9 % раствор натрия хлорида.

Для определения полноты сорбции в 4 пробирки (опытный ряд) наливают надосадочную жидкость испытуемого препарата: в первую пробирку – 1 мл неразведенной надосадочной жидкости, в остальные пробирки вносят по 1 мл надосадочной жидкости, разведенной 0,9% раствором натрия хлорида соответственно в 2, 5, 10 раз. В каждую пробирку добавляют по 1 мл раствора СО антиальфастафилолизина, разведенного до содержания 0,2 МЕ/мл. Пробирки осторожно встряхивают и выдерживают 20

мин при температуре 18 – 20 °С.

Проведение испытания сопровождается 4 контролями:

1. Первый контроль (пробирка № 1) – контроль «полноты» нейтрализации Lh токсина стафилококкового в условиях испытания. В пробирку вносят 1 мл СО антиальфастафилолизина, содержащего 0,2 МЕ/мл антиальфастафилолизина и прибавляют 1мл 0,9 % раствора натрия хлорида.

2. Второй контроль (пробирка № 2) – контроль отсутствия спонтанного лизиса эритроцитов кролика. В пробирку вносят 2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида.

3. Третий контроль (пробирка № 3) – контроль гемолитического действия токсина стафилококкового в условиях испытания. В пробирку вносят 2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида.

4. Четвертый контроль (пробирка № 4) – контроль отсутствия лизиса эритроцитов надосадочной жидкостью. В пробирку вносят 2 мл надосадочной жидкости испытуемого образца.

В пробирки опытного ряда и контрольные пробирки № 1 и № 3 добавляют токсин стафилококковый в дозе Lh/10. В контрольные пробирки № 2 и № 4 токсин не добавляют.

Все пробирки встряхивают и выдерживают 20 мин при температуре (20 ± 2) °С. Далее в каждую пробирку добавляют по 2 капли (0,1 мл) 15 % взвеси эритроцитов, приготовленной в день испытания; пробирки вновь встряхивают и выдерживают в течение 1 ч при температуре (37 ± 1) °С, а затем – 1 ч при температуре (20 ± 2) °С.

Результаты испытания учитывают визуально по степени гемолиза эритроцитов:

«++++» – полный гемолиз эритроцитов;

«+++» – почти полный гемолиз эритроцитов;

«++» – частичный гемолиз (50 % гемолиз эритроцитов);

«+» – следы гемолиза эритроцитов;

«–» – отсутствие гемолиза эритроцитов.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Учет результатов испытания начинают с определения результатов контроля.

В первом, втором и четвертом контроле гемолиз эритроцитов должен отсутствовать. Отсутствие гемолиза в первом контроле свидетельствует о том, что 0,2 МЕ антиальфастафилолизина полностью нейтрализовали гемолитическое действие дозы токсина стафилококкового в условиях испытания; отсутствие гемолиза в четвертом контроле свидетельствует о том, что «цельная» неразведенная надосадочная жидкость не вызывает гемолиза эритроцитов кролика; в третьем контроле должен произойти полный гемолиз эритроцитов.

В пробирках опытного ряда признаков гемолиза не должно быть.

Наличие признаков гемолиза в опытном ряду означает присутствие в надосадочной жидкости свободного стафилококкового анатоксина, который связывает антиальфастафилолизин, и оставшийся свободным токсин стафилококковый вызывает гемолиз эритроцитов кролика.

Пример расчета: в 1 пробирке опытного ряда (неразведенная надосадочная жидкость) зафиксирован почти полный гемолиз (+++). Это означает, что в 1 мл надосадочной жидкости содержится 0,1 ЕС стафилококкового анатоксина, т.к. 0,1 ЕС стафилококкового анатоксина связался с 0,1 МЕ антиальфастафилолизина, а оставшийся свободным токсин стафилококковый вызвал гемолиз эритроцитов кролика.

Примечание.

Приготовление 15 % взвеси эритроцитов кролика и определение Lh токсина в условиях испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания антиальфастафилолизина (специфических антител) в лекарственных препаратах из крови человека и животных».

Производственный штамм. Раздел должен содержать следующую информацию: наименование штамма(ов); место депонирования; морфологическую характеристику; при необходимости – допустимое количество пассажей и методику их проведения с указанием субстрата и

условий культивирования; дополнительные к паспортным данным требования к характеристикам штаммов.

Формальдегид. Не более 30 мкг/мл. Испытание проводят по ОФС «Количественное определение формальдегида в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Консерванты. Тиомерсал (если нет других указаний в нормативной документации). Содержание тиомерсала должно быть от 80 до 120 мкг/мл. Испытание проводят по ОФС «Количественное определение тиомерсала в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Сорбенты. Алюминия гидроксид (если нет других указаний в нормативной документации). Содержание ионов алюминия должно быть от 0,9 до 1,3 мг/мл. Испытание проводят по ОФС «Определение ионов алюминия в сорбированных иммунобиологических лекарственных препаратах».

Показатели, которые отражают качество конечного продукта, но не могут быть определены, должны быть определены на промежуточных стадиях производства, что также должно быть указано в нормативной документации.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

Анатоксин стафилококковый очищенный, раствор для подкожного введения	**ФС.3.3.1.0006.15** **Взамен ГФ X, ст. 62, ФС 42 – 3238 - 95**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на анатоксин стафилококковый очищенный, раствор для подкожного введения, который представляет собой токсин стафилококковый, обезвреженный формалином при нагревании и очищенный от балластных белков способом, гарантирующим полную детоксикацию и отсутствие возможности реверсии токсичности, при сохранении антигенной и иммуногенной активности.

Препарат не содержит консервантов и антибиотиков.

При подкожном введении анатоксин стафилококковый очищенный вызывает образование специфических антител (антитоксинов) против экзотоксина стафилококкового.

Область применения – специфическая иммунотерапия острой и хронической (в стадии обострения) стафилококковой инфекции у взрослых.

ПРОИЗВОДСТВО

При производстве анатоксина стафилококкового очищенного используют штамм *Staphylococcus aureus* O15 (или другой штамм стафилококка, обладающий аналогичными свойствами), который депонирован в официальной коллекции, происхождение и история которого документированы.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

При культивировании на жидких питательных средах штамм должен образовывать токсин стафилококковый (синонимы: экзотоксин, альфатоксин, альфастафилолизин). Метод культивирования должен обеспечивать высокую продукцию токсина, сохранять гемолитические свойства штамма и исключать контаминацию штамма посторонней микрофлорой. Токсинсодержащая культуральная жидкость, освобожденная от микробных клеток и продуктов их распада, должна содержать токсин стафилококковый с гемолитической активностью не менее 500 DHM (минимальная гемолитическая доза) и иметь Lh (лимит гемолитического действия) токсина не более 0,4 мл. Способ детоксикации токсина стафилококкового должен гарантировать отсутствие токсичности и возможность ее реверсии при сохранении антигенной (не менее 2 ЕС/мл) и иммуногенной (способность вызывать образование специфических антител) активности анатоксина стафилококкового.

Для характеристики анатоксина стафилококкового очищенного, раствора для подкожного введения, определяют: pH, прозрачность, цветность, стерильность, аномальную токсичность, специфическую безвредность, специфическую активность, антигенную активность, содержание формальдегида.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачная жидкость бесцветная или светло-желтого цвета. Определяют визуально.

Подлинность. Должен вызывать образование антител к токсину стафилококковому. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания антиальфастафилолизина (специфических антител) в препаратах крови человека и животных».

Прозрачность. Должен быть прозрачным. Определение проводят визуально.

Цветность. Не должен быть окрашен более эталона Y_6. Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

Извлекаемый объём. Не менее номинального. Нормативные требования указывают в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH. От 6,2 до 7,4, если нет других указаний в нормативной документации. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Стерильность. Препарат должен быть стерильным. Определение проводят методом прямого посева в соответствии с ОФС «Стерильность».

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичным.

Белым мышам (5 животным) массой 18–20 г препарат вводят внутрибрюшинно по 0,5 мл, 2 морским свинкам массой 250–300 г подкожно по 2 мл.

Препарат считают выдержавшим испытание, если:

- в течение 7 сут наблюдения все животные остались живы и ни у одного из животных не были выявлены видимые признаки заболевания;
- ни у одного из животных не отмечена потеря массы тела;
- ни у одной морской свинки в месте введения препарата не развился абсцесс или некроз.

Если в течение периода наблюдения регистрируют гибель хотя бы 1 животного, заболевание, уменьшение массы тела или повреждение в месте инъекции, испытание повторяют на удвоенном количестве животных при тех же условиях учета опыта. Повторное испытание считают удовлетворительным, если препарат отвечает вышеперечисленным требованиям.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Специфическая безвредность. Препарат должен быть безвредным.

Кроликам (2 животным) массой 2 – 2,5 кг препарат в дозе 3 мл вводят подкожно в боковую поверхность тела и в той же дозе – внутривенно в краевую вену уха.

Препарат считают выдержавшим испытание, если в течение 5 сут наблюдения кролики остаются здоровыми и в местах введения препарата отсутствуют явления некроза тканей.

Примечание.

Для проведения исследования специфической безвредности и специфической активности (иммуногенности) используют кроликов, у которых в 1 мл сыворотки крови содержится не более 0,125 МЕ (Международных единиц) антиальфастафилолизина. Определение проводят по ОФС «Определение содержания антиальфастафилолизина (специфических антител) в лекарственных препаратах из сыворотки крови человека и животных».

Специфическая активность (иммуногенность). Должен вызывать образование специфических антител при подкожном введении (содержание антиальфастафилолизина (специфических антител) в сыворотке крови иммунизированных кроликов должно быть не менее 3 МЕ в 1 мл (среднеарифметическое значение).

Кроликам (3 животным) массой (2,0 ± 0,5) кг, признанным пригодными для проведения испытания, препарат вводят подкожно в боковую поверхность тела трехкратно с интервалом 5–6 сут в объемах 0,5; 1,0; 1,5 мл. Через 7–9 сут после последней иммунизации у кроликов берут кровь из краевой вены уха и определяют в сыворотке крови каждого животного содержание антиальфастафилолизина. Определение проводят по ОФС «Определение содержания антиальфастафилолизина (специфических антител) в лекарственных препаратах из сыворотки крови человека и животных».

Антигенная активность (антитоксинсвязывающая способность). 1 мл препарата должен содержать от 10 до 14 ЕС (единиц связывания)

стафилококкового анатоксина. 1 ЕС представляет собой минимальное количество анатоксина, которое связывает 1 МЕ (Международную единицу) антиальфастафилолизина.

Метод определения антигенной активности основан на способности стафилококкового анатоксина связывать специфические антитела (антиальфастафилолизин) и на способности антител нейтрализовать гемолитические свойства токсина стафилококкового.

Для постановки реакции используют следующие ингредиенты:

– испытуемый анатоксин стафилококковый;

– стандартный образец (СО) антиальфастафилолизина с установленным содержанием стафилококковых антител (МЕ/мл);

– токсин стафилококковый, гемолитические свойства которого характеризуются величиной Lh (лимит гемолитического действия – минимальное количество токсина стафилококкового, которое, будучи связано с 1 МЕ антиальфастафилолизина, вызывает почти полный (+++) гемолиз эритроцитов кролика);

– 15 % взвесь эритроцитов кролика;

– 0,9 % раствор натрия хлорида.

Определение антитоксинсвязывающей способности анатоксина стафилококкового сопровождается 4 контролями.

1 контроль – служит для коррекции учета результатов опытного ряда, т.к. в нем определяется количество МЕ (Международных единиц) анти-альфастафилолизина, которое нейтрализует Lh токсина стафилококкового в условиях опыта. СО антиальфастафилолизина разводят 0,9 % раствором натрия хлорида до содержания 1 МЕ в 1 мл, разливают в ряд пробирок в объеме 0,8; 0,9; 1; 1,1; 1,2 мл и доводят общий объем в каждой пробирке 0,9 % раствором натрия хлорида до 2 мл. Таким образом, первый контроль состоит из ряда пробирок, содержащих от 0,8 до 1,2 МЕ антиальфастафилолизина.

2 контроль – контроль «полноты» нейтрализации Lh токсина стафилококкового специфическими антителами в условиях опыта. В пробирку наливают 1 мл раствора СО антиальфастафилолизина, разведенного до содержания 2 МЕ/мл, и доводят общий объем 0,9 % раствором натрия хлорида до 2 мл.

3 контроль – контроль отсутствия спонтанного лизиса эритроцитов кролика. В пробирку вносят 2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида.

4 контроль – контроль гемолитического действия токсина стафилококкового на эритроциты кролика в условиях опыта. В пробирку вносят 2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида.

Опытный ряд – испытуемый препарат разводят 0,9 % раствором натрия хлорида в 8, 10, 12, 14 и 16 раз. Переносят в пробирки по 1 мл приготовленных разведений и добавляют в них по 1 мл раствора СО антиальфастафилолизина, содержащего 2 МЕ/мл. Пробирки осторожно встряхивают и выдерживают 20 мин при температуре (20 ± 2) °С.

Затем в пробирки опытного и контрольных рядов (кроме третьего) добавляют токсин стафилококковый в объеме Lh, установленном в день проведения испытания. Все пробирки встряхивают и выдерживают 20 мин при температуре (20 ± 2) °С. Далее в каждую пробирку добавляют по 0,1 мл свежеприготовленной 15 % взвеси эритроцитов, пробирки вновь встряхивают и выдерживают в течение 1 ч при температуре (37 ± 1) °С, а затем – 1 ч при температуре (20 ± 2) °С.

Результаты учитывают визуально по степени гемолиза эритроцитов:

«++++» – полный гемолиз (прозрачная ярко окрашенная жидкость);

«+++» – почти полный гемолиз (опалесцирующая окрашенная жидкость);

«++» – частичный гемолиз (надосадочная жидкость,– окрашена);

«+» – слабый гемолиз (надосадочная жидкость,– слегка окрашена);

«–» – отсутствие гемолиза (надосадочная жидкость,– прозрачная,

бесцветная).

Учет результатов опыта начинают с определения результатов контроля.

Во втором и третьем контроле гемолиз эритроцитов должен отсутствовать. Отсутствие гемолиза во втором контроле свидетельствует, о том, что антиальфастафилолизин в дозе 2 МЕ полностью нейтрализовал гемолитическое действие дозы токсина стафилококкового в опыте; в четвертом контроле должен произойти полный гемолиз эритроцитов.

Учет результатов опытного ряда проводят в сравнении с результатами первого контрольного ряда–учитывают первые пробирки, в которых произошел почти полный гемолиз «+++».

При оптимальных условиях опыта почти полный гемолиз «+++» должен произойти в пробирке контрольного ряда, содержащей 1 МЕ антиальфастафилолизина. В той пробирке опытного ряда, в которой зафиксирован также почти полный гемолиз «+++», вызываемый оставшимся свободным стафилококковым токсином, испытуемый анатоксин связал 1 МЕ антиальфастафилолизина и, следовательно, в ней содержится 1 ЕС (единица связывания) анатоксина.

Антигенная активность (антитоксическая способность) (АС) стафилококкового анатоксина, выраженная в единицах связывания (ЕС), рассчитывается по следующей формуле:

$$АС = n \cdot (2 - a),$$

где n – кратность разведения испытуемого анатоксина в опыте;

2 – количество МЕ антиальфастафилолизина в опыте;

a – количество МЕ антиальфастафилолизина, затраченное на нейтрализацию дозы токсина стафилококкового в первом контрольном ряду;

$(2 - a)$ – количество МЕ антиальфастафилолизина, связанное испытуемым анатоксином в условиях опыта, являющееся эквивалентом количества единиц связывания (ЕС) анатоксина в опыте.

Если почти полный гемолиз «+++» произошел в пробирке

контрольного ряда, содержащей 1 МЕ антиальфастафилолизина, и аналогичный результат зафиксирован в пробирке опытного ряда, содержащей испытуемый анатоксин, разведенный в 12 раз, следовательно, в 1 мл испытуемого анатоксина содержится 12·(2–1) =12 ЕС.

Если почти полный гемолиз «+++» произошел в пробирке контрольного ряда, содержащей 0,9 МЕ антиальфастафилолизина, и аналогичный результат получен в пробирке опытного ряда, содержащей испытуемый анатоксин, разведенный в 10 раз, то 1 мл испытуемого анатоксина содержит 10·(2–0,9) = 10·1,1 = 11 ЕС.

Если почти полный гемолиз «+++» произошел в пробирке контрольного ряда, содержащей 1,1 МЕ антиальфастафилолизина, и аналогичный результат зафиксирован в пробирке опытного ряда, содержащей анатоксин, разведенный в 14 раз, то 1 мл испытуемого анатоксина содержит 14·(2–1,1) = 14·0,9 = 12,6 ЕС.

Примечание.

Приготовление 15 % взвеси эритроцитов кролика и определение величины Lh токсина проводят по ОФС «Определение содержания антиальфастафилолизина (специфических антител) в лекарственных препаратах из сыворотки крови человека и животных».

Производственный штамм. Раздел должен содержать следующую информацию: наименование штамма(ов); место их депонирования; морфологическую характеристику; при необходимости допустимое количество пассажей и методику их проведения с указанием субстрата и условий культивирования; дополнительные к паспортным данным требования к характеристикам штаммов.

Показатели, которые отражают качество конечного продукта, но не могут быть определены, должны быть определены на промежуточных стадиях производства, что также должно быть отражено в нормативной документации.

Формальдегид. Не более 30 мкг/мл. Испытание проводят по ОФС «Количественное определение формальдегида в иммунобиологических

лекарственных препаратах».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Анатоксин столбнячный адсорбированный (АС-анатоксин)	**ФС.3.3.1.0007.15 Взамен ГФ X ст. 64, ФС 42-3359-95**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на иммунобиологический лекарственный препарат анатоксин столбнячный адсорбированный (АС-анатоксин), который представляет собой столбнячный анатоксин, полученный из столбнячного экзотоксина путем обезвреживания формальдегидом при нагревании, очищенный и адсорбированный на алюминия гидроксиде или другом разрешенном к применению минеральном сорбенте. АС-анатоксин предназначен для специфической профилактики столбняка.

ПРОИЗВОДСТВО

Все этапы производства АС-анатоксина должны быть валидированы с целью подтверждения установленных требований и должны гарантировать безопасность его применения.

При производстве столбнячного анатоксина используют штаммы/штамм *Clostridium tetani*, полученные и депонированные в Государственной коллекции. Микробные клетки культивируют на жидких питательных средах, обеспечивающих высокую продукцию столбнячного токсина. Методы культивирования должны гарантировать сохранение свойств штаммов и предотвращать их контаминацию. Токсинсодержащую культуральную жидкость, освобожденную от микробных клеток и продуктов их распада, проверяют на стерильность, pH и содержание токсина. Для производства столбнячного анатоксина используют культуральную среду с

активностью токсина не ниже 15 $L+/_{100}$ в 1 мл. Детоксикация столбнячного токсина должна обеспечивать сохранение антигенной активности анатоксина и гарантировать его безопасность: отсутствие остаточной токсичности (специфическая безопасность) и реверсии токсических свойств.

Определение специфической безопасности столбнячного анатоксина. Испытание проводят на 5 морских свинках массой 250–350 г, которым вводят подкожно 1500 Lf (суммарно в бок и внутреннюю поверхность верхней трети бедра) столбнячного анатоксина. В течение 21 сут наблюдения у животных не должно наблюдаться признаков столбняка (ригидность лапки, искривление позвоночника или сочетание указанных признаков) и потери массы тела. Если наблюдается гибель более 1 животного по причине, не связанной со специфической интоксикацией, испытание повторяют. Если при повторном испытании устанавливают гибель более 1 животного, столбнячный анатоксин испытание не проходит.

Реверсия токсичности столбнячного анатоксина. Готовят раствор, содержащий столбнячный анатоксин и консервант (при его наличии) в 0,9 % растворе натрия хлорида в концентрации, принятой для готового продукта. Полученную смесь делят на 2 части и выдерживают в течение 42 сут: первую – при температуре (37 ± 1) °С, вторую – при температуре от 2 до 8 °С. Каждый образец вводят подкожно 5 морским свинкам массой 250 – 350 г в объеме 5 мл (по 2,5 мл в оба бока). Наличие признаков столбняка в течение 21 сут наблюдения за животными свидетельствует о присутствии в пробе столбнячного токсина.

Для характеристики очищенного столбнячного анатоксина определяют его pH, специфическую (антигенную) активность, содержание общего и белкового азота, антигенную чистоту (удельную активность).

Столбнячный анатоксин должен быть очищен от примесей, вызывающих побочные реакции при введении человеку.

Для производства АС-анатоксина можно использовать только стерильный и безопасный столбнячный анатоксин со специфической

(антигенной) активностью не ниже 200 ЕС/Lf в 1 мл и антигенной чистотой не менее 1000 ЕС (или Lf) на мг белкового азота.

Показатели, которые влияют на качество, но не могут быть определены в конечном продукте, должны быть проверены на промежуточных стадиях производства, что должно быть отражено в нормативной документации.

Прививочная доза (0,5 мл) содержит 10 ЕС столбнячного анатоксина. В состав лекарственного средства может входить антимикробный консервант.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Опалесцирующая жидкость белого цвета, которая может иметь сероватый или желтоватый оттенок. При отстаивании разделяется на рыхлый осадок белого или белого с сероватым или желтоватым оттенком цвета, легко диспергирующийся при встряхивании, и прозрачную бесцветную надосадочную жидкость. Испытания проводят визуально в проходящем свете.

Подлинность. Должен обладать специфической (иммуногенной) активностью, обеспечивая защиту от действия столбнячного токсина (раздел «Специфическая активность»). В нормативной документации производителя могут быть указаны альтернативные методы, подтверждающие наличие в лекарственном средстве столбнячного анатоксина, обладающего антигенной активностью.

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH. Значения pH указывают в нормативной документации. Испытания проводят потенциометрическим методом с неразведенным АС-анатоксином в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Размер частиц (дисперсность). Препарат АС-анатоксина, диспергированный путем встряхивания, должен свободно проходить в шприц через иглу № 0840, если нет других указаний в нормативной документации.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Определение проводят в соответствии с ОФС «Инъекционные лекарственные формы. Лекарственные средства для парентерального применения».

Время седиментационной устойчивости. После встряхивания и получения гомогенной взвеси не должно наблюдаться полного расслаивания в течение не менее 1 мин, если нет других указаний в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Инъекционные лекарственные формы. Лекарственные средства для парентерального применения».

Стерильность. Должен быть стерильным. Испытания проводят методами прямого посева или мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность». Для контроля используют тиогликолевую среду. Посевы инкубируют при температуре 30 – 35 и 20 – 25 ºС.

Аномальная токсичность. Должен быть нетоксичным. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Белым мышам препарат вводят внутрибрюшинно по 1 мл, морским свинкам – подкожно по 5 мл (по 2,5 мл в оба бока). За животными наблюдают 7 сут. В течение указанного времени не должны наблюдаться гибель животных и потеря массы тела.

Специфическая безопасность. Должен быть безопасным при подкожном введении 5 морским свинкам массой (300 ± 50) г 10 прививочных доз для человека (по 2,5 мл в бок и бедро). Срок наблюдения 21 сут. В течение указанного времени все животные должны оставаться живыми, без симптомов столбняка и потери массы тела. В случае гибели 1 животного или потери массы тела хотя бы одним из животных от неспецифических причин испытание повторяют. Если при повторном испытании установлена гибель более 1 животного, лекарственный препарат считают не соответствующим требованиям.

Специфическая (иммуногенная) активность. Прививочная доза (0,5 мл) для человека должна обладать активностью не ниже 40 МЕ. Определение проводят в соответствии с ОФС «Иммуногенность адсорбированного

столбнячного анатоксина».

Полнота сорбции. В 1 мл надосадочной жидкости АС-анатоксина содержание неадсорбированного столбнячного анатоксина не должно превышать 0,1 ЕС, если нет иных указаний в нормативной документации производителя. Полноту сорбции определяют путем индикации антигена в надосадочной жидкости с помощью реакции антитоксинсвязывания в соответствии с ОФС «Определение содержания столбнячного анатоксина в реакции антитоксинсвязывания», если нет иных указаний в нормативной документации.

Формальдегид. Не более 200 мкг/мл. Определение проводят колориметрическим методом в соответствии с ОФС «Количественное определение формальдегида в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Производственные штаммы микроорганизмов. Раздел должен содержать следующую информацию: наименование штаммов; место их депонирования; допустимое количество пассажей (при необходимости) и методику их проведения с указанием субстрата культивирования; при необходимости – дополнительные к паспортным данным требования к характеристикам штаммов.

Консерванты. Концентрация консерванта не должна быть ниже минимально эффективной и не должна превышать указанную на упаковке более чем на 15 %. В качестве консерванта используется тиомерсал. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение тиомерсала в иммунобиологических лекарственных препаратах». Не рекомендуется использование консервантов при производстве лекарственных препаратов, выпускаемых в однодозовой расфасовке.

Сорбенты. Алюминия гидроксид. Не более 1,1 мг/мл алюминия(III), если в нормативной документации нет иных указаний. Определение проводят комплексонометрическим методом в соответствии с ОФС «. Определение ионов алюминия в сорбированных иммунобиологических

лекарственных препаратах».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты». На первичную упаковку наносят дополнительное указание «Встряхивать!». На вторичную упаковку наносят дополнительные указания «Перед употреблением встряхивать», «Замораживание не допускается».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Триатоксин адсорбированный	**ФС.3.3.1.0008.15** **Взамен ФС 42-3260-96**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на триатоксин адсорбированный, который представляет собой смесь ботулинических анатоксинов типов А, В и Е, полученных из соответствующих экзотоксинов ботулизма путем обезвреживания формальдегидом при нагревании, которые адсорбированы на алюминия гидроксиде или другом разрешенном к применению минеральном сорбенте.

Триатоксин предназначен для специфической профилактики ботулизма.

ПРОИЗВОДСТВО

Ботулинические анатоксины типов А, В и Е получают путем детоксикации соответствующих экзотоксинов.

Для получения ботулинических токсинов используют высокотоксигенные штаммы *Clostridium botulinum,* продуцирующие ботулотоксины типов А, В и Е, полученные и депонированные в Государственной коллекции. Микробные клетки культивируют на жидких питательных средах, обеспечивающих высокую степень токсинообразования.

Прививочная доза триатоксина (1 мл) содержит 5 ЕС ботулинического анатоксина типа А и по 3 ЕС ботулинических анатоксинов типов В и Е. В состав лекарственного средства может входить антимикробный консервант.

Методы детоксикации ботулинических экзотоксинов должны обеспечивать сохранение антигенной активности полученных анатоксинов и

гарантировать их безопасность – отсутствие остаточной токсичности и реверсии токсических свойств.

Ботулинические анатоксины должны быть максимально очищены от балластных примесей.

Показатели, которые влияют на качество, но не могут быть определены в конечном продукте, должны быть проверены на промежуточных стадиях производства, что должно быть отражено в нормативной документации производителя.

ИСПЫТАНИЕ БОТУЛИНОЧЕСКИХ АНАТОКСИНОВ типов А, В и Е НА СТАДИЯХ ПРОИЗВОДСТВА

Антигенная активность. Антигенную активность ботулинических анатоксинов выражают в единицах связывания (ЕС). Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания анатоксинов/токсинов в реакции антитоксинсвязывания». Для получения трианатоксина используют очищенные ботулинические анатоксины с активностью не ниже 200 ЕС/мл для анатоксина типа А, 80 ЕС/мл для анатоксина типа В и 20 ЕС/мл для анатоксина типа Е.

Удельная активность. Ботулинические анатоксины типа А, В и Е должны обладать удельной активностью соответственно не ниже 1000, 500 и 150 ЕС на мг белкового азота.

Специфическая безопасность. В течение 21 сут наблюдения у животных не должно наблюдаться признаков специфической интоксикации и некрозов в месте инъекции.

5 морским свинкам с массой тела 300–350 г вводят подкожно не менее 600 ЕС ботулинического анатоксина типа А, 120 ЕС ботулинического анатоксина типа В или 60 ЕС ботулинического анатоксина типа Е в объеме 5 мл (по 2,5 мл в область правого и левого бока). К 21 суткам наблюдения не должно наблюдаться потери массы тела. Если более одного животного

гибнут по причине, не связанной со специфической интоксикацией, испытание повторяют на удвоенном количестве животных. Если при повторном испытании гибнет более одного животного, анатоксин считают не прошедшим испытание.

Реверсия токсичности. Анатоксины, выдержанные при температуре (37±1) ºС и при температуре от 2 до 8 ºС не должны вызывать симптомов специфической интоксикации.

Готовят растворы ботулинических токсинов , содержащие в 1 мл 5 ЕС ботулинического токсина типа А, 3 ЕС ботулинических токсинов типов В или Е и консервант (при его наличии) в 0,9 % растворе натрия хлорида в концентрации, принятой для готового продукта. Полученные смеси делят на две части и выдерживают в течение 42 сут: первую – при температуре (37±1) ºС, вторую – при температуре от 2 до 8 ºС. Каждый образец вводят внутрибрюшинно 5 белым мышам с массой тела (17 ± 1) г в объеме 1 мл. За животными наблюдают в течение 4 сут.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Опалесцирующая жидкость белого цвета; может иметь сероватый или желтоватый оттенок. При отстаивании разделяется на рыхлый осадок белого или белого с сероватым или желтоватым оттенком цвета, легко разбивающийся при встряхивании, и прозрачную бесцветную надосадочную жидкость. Испытания проводят визуально в проходящем свете.

Подлинность. Должен содержать ботулинические анатоксины типов А, В и Е, обладающие специфической активностью, обеспечивая защиту от действия соответствующих токсинов (раздел «Специфическая активность»). В нормативной документации производителя могут быть указаны альтернативные методы, подтверждающие наличие в лекарственном средстве ботулинических анатоксинов.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH. От 6,0 до 7,0, если в нормативной документации нет других указаний. Испытания проводят потенциометрическим методом с неразведенным трианатоксином в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Размер частиц (дисперсность). Должен свободно проходить в шприц через иглу № 0840, если нет других указаний в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Инъекционные лекарственные формы. Лекарственные средства для парентерального применения».

Время седиментационной устойчивости. После встряхивания и получения гомогенной взвеси не должно наблюдаться полного расслаивания в течение не менее 1 мин, если нет других указаний в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Инъекционные лекарственные формы. Лекарственные средства для парентерального применения».

Стерильность. Должен быть стерильным. Испытания проводят методами прямого посева в соответствии с ОФС «Стерильность». Для контроля используют тиогликолевую среду. Посевы инкубируют при температуре 30 – 35 ºС и 20 – 25 ºС.

Аномальная токсичность. Должен быть нетоксичным. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Белым мышам препарат вводят внутрибрюшинно по 1 мл, морским свинкам – подкожно по 5 мл (по 2,5 мл в оба бока).

Специфическая безопасность. Должен быть безопасным. Испытания проводят при подкожном введении 5 морским свинкам массой (325 ± 25) г 5 прививочных доз для человека (по 2,5 мл в оба бока). Через 21 сут все животные должны остаться живыми без признаков специфической интоксикации. В случае гибели или потери массы тела 1 из животных от

неспецифических причин испытание повторяют. Если при повторном испытании гибнет более 1 животного, лекарственный препарат не соответствует требованиям.

Специфическая (иммуногенная) активность. Должен обладать иммуногенной активностью в отношении каждого из анатоксинов, входящих в его состав. Выживаемость иммунизированных мышей при летальном заражении должна составлять не менее 70 % для каждого компонента препарата. Условия проведения испытания по оценке иммуногенной активности компонентов препарата трианатоксин представлены в табл.

Таблица – **Схема опыта по испытанию специфической (иммуногенной) активности трианатоксина**

Компонент трианатоксина	Иммунизирующая доза		Разрешающая доза токсина/ способ введения
	ЕС	мл	
Анатоксин ботулинический типа А	5	1,0	25 LD_{50} /внутривенно
Анатоксин ботулинический типа В	1,2	0,4	50 LD_{50} /внутривенно
Анатоксин ботулинический типа Е	1,2	0,4	25 LD_{50} /внутривенно

Испытания специфической активности проводят на мышах (самцах и самках) линии Balb/c массой (17 ± 1) г. Иммунизацию проводят внутрибрюшинно группам не менее чем из 10 животных. Разрешающие дозы токсинов вводят животным спустя 21 сут после иммунизации. Опыты сопровождают контролем активности токсинов, которые вводят внутривенно по 0,5; 1 и 2 LD_{50} каждого токсина не менее чем 4 животным из той же партии. Результаты оценивают ежедневно в течение 4 сут. Результаты опыта учитывают, если при контроле активности токсинов введение дозы 2 LD_{50} вызвало гибель 100 %, а дозы, равной 1 LD_{50}, – не менее 50 % мышей к концу срока наблюдения.

Полнота сорбции. В 1 мл надосадочной жидкости содержание неадсорбированного ботулинического анатоксина типа А должно быть не более 0,25 ЕС, типов В и Е – 0,15 ЕС, если нет других указаний в нормативной документации. Полноту сорбции определяют путем индикации

неадсорбированных ботулинических анатоксинов в надосадочной жидкости препарата. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания анатоксинов в реакции антитоксинсвязывания».

Формальдегид. Не более 100 мкг/мл. Определение проводят колориметрическим методом в соответствии с ОФС « Количественное определение формальдегида в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Производственные штаммы микроорганизмов. Раздел должен содержать следующую информацию: наименование штаммов; место их депонирования; допустимое количество пассажей (при необходимости) и методику их проведения с указанием условий культивирования; при необходимости – дополнительные к паспортным данным требования к характеристикам штаммов.

Консерванты. Концентрация консерванта не должна быть ниже минимально эффективной и не превышать, указанную на упаковке более чем на 15 %. В качестве консерванта аиболее часто используется тиомерсал. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение тиомерсала в иммунобиологических лекарственных препаратах». Не рекомендуется использование консервантов при производстве лекарственных препаратов, выпускаемых в однодозовой расфасовке.

Сорбенты. Алюминия гидроксид. Содержание алюминия(III) должно быть не более 1,2 мг/мл, если в нормативной документации нет других указаний. Определение проводят комплексонометрическим методом в соответствии с ОФС «Определение ионов алюминия в сорбированных иммунобиологических лекарственных препаратах».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС

«Иммунобиологические лекарственные препараты». На первичную упаковку наносят дополнительное указание: «Встряхивать!». На вторичную упаковку наносят дополнительные указания: «Перед употреблением встряхивать», «Замораживание не допускается».

Транспортирование и хранение. Должен транспортироваться и храниться при температуре от 2 до 8 °С.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Тетраанатоксин адсорбированный	**ФС.3.3.1.0009.15** **Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на тетраанатоксин адсорбированный, который представляет собой смесь ботулинических анатоксинов типов А, В и Е и столбнячного анатоксина, полученных из соответствующих экзотоксинов путем обезвреживания формальдегидом при нагревании, которые адсорбированы на алюминия гидроксиде или другом разрешенном к применению минеральном сорбенте.

Тетраанатоксин предназначен для специфической профилактики ботулизма и столбняка.

ПРОИЗВОДСТВО

Ботулинические анатоксины типов А, В и Е и столбнячный анатоксин получают путем детоксикации соответствующих токсинов.

Для получения ботулинических и столбнячного токсинов используют высокотоксигенные штаммы *Clostridium botulinum*, продуцирующие ботулотоксины типов А, В и Е, и *Clostridium tetani*, полученные и депонированные в Государственной коллекции. Микробные клетки культивируют на жидких питательных средах, обеспечивающих высокую степень токсинообразования.

Прививочная доза тетраанатоксина (1 мл) содержит 5 ЕС ботулинического анатоксина типа А, по 3 ЕС ботулинических анатоксинов типов В и Е и 2,5 ЕС столбнячного анатоксина. В состав лекарственного средства может входить антимикробный консервант.

Методы детоксикации ботулинических и столбнячных экзотоксинов должны обеспечивать сохранение антигенной активности полученных

анатоксинов и гарантировать их безопасность – отсутствие остаточной токсичности и реверсии токсических свойств.

Ботулинические и столбнячный анатоксины должны быть максимально очищены от балластных примесей.

Показатели, которые влияют на качество, но не могут быть определены в конечном продукте, должны быть проверены на промежуточных стадиях производства, что должно быть отражено в нормативной документации.

Испытание ботулиноческих анатоксинов типов А, В и Е и столбнячного анатоксина на стадиях производства

Антигенная активность. Антигенную активность ботулинических и столбнячного анатоксинов выражают в единицах связывания (ЕС). Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания анатоксинов/токсинов в реакции антитоксинсвязывания». Для получения тетраанатоксина используют очищенные ботулинические анатоксины с активностью не ниже 200 ЕС/мл для анатоксина типа А, 80 ЕС/мл для анатоксина типа В и 20 ЕС/мл для анатоксина типа Е, для столбнячного анатоксина не ниже 200 ЕС/мл.

Удельная активность. Ботулинические анатоксины типа А, В и Е должны обладать удельной активностью соответственно не ниже 1000, 500 и 150 ЕС на мг белкового азота. Столбнячный анатоксин должен обладать удельной активностью не ниже 1000 ЕС на мг белкового азота.

Специфическая безопасность столбнячного анатоксина. В течение 21 сут наблюдения у животных не должно наблюдаться признаков столбняка (ригидность лапки, искривление позвоночника, или сочетание указанных признаков) и потери массы тела.

5 морским свинкам с массой тела 250–350 г вводят подкожно 1500 ЕС столбнячного анатоксина (суммарно в бок и внутреннюю поверхность верхней трети бедра). Если более одного животного гибнет по причине, не

связанной со специфической интоксикацией, испытание повторяют. Если при повторном испытании гибнет более одного животного, столбнячный анатоксин считают не прошедшим испытание.

Специфическая безопасность ботулинических анатоксинов. В течение 21 сут наблюдения у животных не должно наблюдаться признаков специфической интоксикации и некрозов в месте инъекции.

5 морским свинкам с массой тела 300–350 г вводят подкожно не менее 600 ЕС ботулинического анатоксина типа А, 120 ЕС ботулинического анатоксина типа В или 60 ЕС ботулинического анатоксина типа Е в объеме 5 мл (по 2,5 мл в область правого и левого бока). К 21 суткам наблюдения не должно наблюдаться потери массы тела. Если более одного животного гибнут по причине, не связанной со специфической интоксикацией, испытание повторяют на удвоенном количестве животных. Если при повторном испытании гибнет более одного животного, анатоксин считают не прошедшим испытание.

Реверсия токсичности ботулинических анатоксинов. Анатоксины, выдержанные при температуре (37±1) ºС и при температуре от 2 до 8 ºС не должны вызывать симптомов специфической интоксикации.

Готовят растворы ботулинических токсинов , содержащие в 1 мл 5 ЕС ботулинического токсина типа А, 3 ЕС ботулинических токсинов типов В или Е и консервант (при его наличии) в 0,9 % растворе натрия хлорида в концентрации, принятой для готового продукта. Полученные смеси делят на две части и выдерживают в течение 42 сут: первую – при температуре (37±1) ºС, вторую – при температуре от 2 до 8 ºС. Каждый образец вводят внутрибрюшинно 5 белым мышам с массой тела (17 ± 1) г в объеме 1 мл. За животными наблюдают в течение 4 сут.

Реверсия токсичности столбнячного анатоксина. В течение 21 сут наблюдения у животных не должно наблюдаться признаков столбняка. Готовят раствор, содержащий столбнячный анатоксин, консервант (при его

наличии) в 0,9 % растворе натрия хлорида в концентрации, принятой для готового продукта. Полученную смесь делят на две части и выдерживают в течение 42 сут: первую – при температуре (37±1) °С, вторую – при температуре от 2 до 8 °С. Каждый образец вводят подкожно 5 морским свинкам с массой тела 250-350 г в объеме 5 мл (по 2,5 мл в оба бока). Наличие признаков столбняка в течение 21 сут наблюдения за животными свидетельствует о присутствии в пробе столбнячного токсина.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Опалесцирующая жидкость белого цвета; может иметь сероватый или желтоватый оттенок. При отстаивании разделяется на рыхлый осадок белого или белого с сероватым или желтоватым оттенком цвета, легко разбивающийся при встряхивании, и прозрачную бесцветную надосадочную жидкость. Испытания проводят визуально в проходящем свете.

Подлинность. Должен содержать анатоксины – ботулинические типов А, В и Е и столбнячный, обладающие специфической активностью, обеспечивая защиту от действия соответствующих токсинов (раздел «Специфическая активность»). В нормативной документации производителя могут быть указаны альтернативные методы, подтверждающие наличие в лекарственном средстве ботулинических и столбнячного анатоксинов.

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH. От 6,0 до 7,0, если в нормативной документации нет других указаний. Испытания проводят потенциометрическим методом с неразведенным тетраанатоксином в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Размер частиц (дисперсность). Препарат должен свободно проходить в шприц через иглу № 0840, если нет других указаний в нормативной

документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Инъекционные лекарственные формы. Лекарственные средства для парентерального применения».

Время седиментационной устойчивости. После встряхивания и получения гомогенной взвеси не должно наблюдаться полного расслаивания в течение не менее 1 мин, если нет других указаний в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Инъекционные лекарственные формы. Лекарственные средства для парентерального применения».

Стерильность. Должен быть стерильным. Испытания проводят методами прямого посева в соответствии с ОФС «Стерильность». Для контроля используют тиогликолевую среду. Посевы инкубируют при температуре 30 – 35 °С и 20 – 25 °С.

Аномальная токсичность. Должен быть нетоксичным. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Белым мышам препарат вводят внутрибрюшинно по 1 мл, морским свинкам – подкожно по 5 мл (по 2,5 мл в оба бока).

Специфическая безопасность. Должен быть безопасным. Испытания проводят при подкожном введении 5 морским свинкам массой (325 ± 25) г 5 прививочных доз для человека (по 2,5 мл в оба бока). Через 21 сут все животные должны остаться живыми без признаков специфической интоксикации. В случае гибели или потери массы тела 1 из животных от неспецифических причин испытание повторяют. Если при повторном испытании гибнет более 1 животного, лекарственный препарат не соответствует требованиям.

Специфическая (иммуногенная) активность. Должен обладать иммуногенной активностью в отношении каждого из анатоксинов, входящих в его состав. Выживаемость иммунизированных мышей при летальном заражении должна составлять не менее 70 % для каждого компонента

Федеральная электронная медицинская библиотека ЭЭМБ

препарата. Условия проведения испытания по оценке иммуногенной активности компонентов препарата представлены в табл.

Таблица – **Схема опыта по испытанию специфической (иммуногенной) активности тетраанатоксина**

Компонент тетраанатоксина	Иммунизирующая доза		Разрешающая доза токсина/ способ введения
	ЕС	мл	
Анатоксин ботулинический типа А	5	1,0	25 LD_{50} /внутривенно
Анатоксин ботулинический типа В	1,2	0,4	50 LD_{50} /внутривенно
Анатоксин ботулинический типа Е	1,2	0,4	25 LD_{50} /внутривенно
Анатоксин столбнячный	2,0	0,8	100 LD_{50} /подкожно

Испытания специфической активности ботулинических анатоксинов типов А, В и Е, входящих в состав тетраанатоксина, проводят на мышах линии Balb/c, столбнячного анатоксина – на белых беспородных мышах или мышах линии Balb/c (самцах и самках) массой (17 ± 1) г. Иммунизацию для оценки специфической активности ботулинических анатоксинов проводят внутрибрюшинно, столбнячного анатоксина – подкожно, в область внутренней поверхности верхней трети бедра группам из не менее чем 10 животных. Разрешающие дозы токсинов вводят животным внутривенно спустя 21 сут после иммунизации. Опыты сопровождают контролем активности токсинов при введении по 0,5; 1 и 2 LD_{50} каждого токсина не менее чем 4 животным из той же партии. Наблюдение за животными проводят в течение 4 сут. Результаты опыта учитывают, если при контроле активности токсинов введение дозы 2 LD_{50} вызвало гибель 100 % животных, а дозы, равной 1 LD_{50} ,– не менее 50 % мышей к концу срока наблюдения.

Полнота сорбции. В 1 мл надосадочной жидкости содержание неадсорбированного ботулинического анатоксина типа А должно быть не более 0,25 ЕС, типов В и Е – 0,15 ЕС, неадсорбированного столбнячного анатоксина – не более 0,1 ЕС, если нет других указаний в нормативной документации. Полноту сорбции определяют путем индикации неадсорбированных ботулинических и столбнячного анатоксинов в

надосадочной жидкости препарата. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания анатоксинов/токсинов в реакции антитоксинсвязывания».

Формальдегид. Не более 100 мкг/мл. Определение проводят колориметрическим методом в соответствии с ОФС «Количественное определение формальдегида в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Производственные штаммы микроорганизмов. Раздел должен содержать следующую информацию: наименование штаммов; место их депонирования; допустимое количество пассажей (при необходимости) и методику их проведения с указанием условий культивирования; при необходимости – дополнительные к паспортным данным требования к характеристикам штаммов.

Консерванты. Концентрация консерванта не должна быть ниже минимально эффективной и не превышать указанную на упаковке более чем на 15 %. В качестве консерванта наиболее часто используется тиомерсал. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение тиомерсала в иммунобиологических лекарственных препаратах». Не рекомендуется использование консервантов при производстве лекарственных препаратов, выпускаемых в однодозовой расфасовке.

Сорбенты. Алюминия гидроксид. Не более 1,2 мг/мл алюминия(III), если в нормативной документации нет иных указаний. Определение проводят комплексонометрическим методом в соответствии с ОФС «Определение ионов алюминия в сорбированных иммунобиологических лекарственных препаратах».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС

«Иммунобиологические лекарственные препараты». На первичную упаковку наносят дополнительное указание: «Встряхивать!». На вторичную упаковку наносят дополнительные указания: «Перед употреблением встряхивать», «Замораживание не допускается».

Транспортирование и хранение. Должен транспортироваться и храниться при температуре от 2 до 8 °С.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Вакцина коклюшно-дифтерийно-столбнячная адсорбированная (АКДС-вакцина)	**ФС.3.3.1.0010.15** **Взамен ФС 42-3362-97**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на иммунобиологический лекарственный препарат - вакцину коклюшно-дифтерийно-столбнячную адсорбированную (АКДС-вакцину), которая представляет собой смесь инактивированных коклюшных клеток и обезвреженных формальдегидом при нагревании дифтерийного и столбнячного токсинов, очищенных и адсорбированных на алюминия гидроксиде или другом разрешенном к применению минеральном сорбенте.

В состав лекарственного средства может входить антимикробный консервант.

АКДС-вакцина предназначена для специфической профилактики коклюша, дифтерии и столбняка.

ПРОИЗВОДСТВО

Все этапы производства АКДС-вакцины должны быть валидированы с целью подтверждения установленных требований и должны гарантировать безопасность ее применения.

Столбнячный анатоксин

При производстве столбнячного анатоксина используют штаммы/штамм *Clostridium tetani*, полученные и депонированные в Государственной коллекции. Микробные клетки культивируют на жидких питательных средах, обеспечивающих высокую продукцию столбнячного токсина. Методы культивирования должны гарантировать сохранение

свойств штаммов и предотвращать их контаминацию. Токсинсодержащую культуральную жидкость, освобожденную от микробных клеток и продуктов их распада, проверяют на стерильность, pH и содержание токсина. Для производства столбнячного анатоксина используют культуральную среду с активностью токсина не менее 15 $L+/_{100}$ в 1 мл. Детоксикация столбнячного токсина должна обеспечивать сохранение антигенной активности анатоксина и гарантировать его безопасность – отсутствие остаточной токсичности (специфическая безопасность) и реверсии токсических свойств. Столбнячный анатоксин должен быть очищен от примесей, вызывающих побочные реакции при введении человеку. Для характеристики очищенного столбнячного анатоксина определяют pH, специфическую (антигенную) активность, содержание общего и белкового азота, антигенную чистоту (удельную активность).

Определение специфической безопасности столбнячного анатоксина. Вводят подкожно 5 морским свинкам массой 250 – 350 г 1500 Lf столбнячного анатоксина (суммарно в бок и внутреннюю поверхность верхней трети бедра). В течение 21 сут наблюдения у животных не должны обнаруживаться признаки столбняка (ригидность лапки, искривление позвоночника или сочетание указанных признаков) и потери массы тела. Если фиксируют гибель более 1 животного по причине, не связанной со специфической интоксикацией, испытание повторяют. Если при повторном испытании наблюдают гибель более 1 животного, столбнячный анатоксин считают не прошедшим испытание.

Реверсия токсичности столбнячного анатоксина. Готовят раствор, содержащий столбнячный анатоксин, консервант (при его наличии) в 0,9 % растворе натрия хлорида в концентрации, принятой для готового продукта. Полученную смесь делят на 2 части и выдерживают в течение 42 сут: первую – при температуре (37 ± 1) °С, вторую – при температуре от 2 до 8 °С. Каждый образец вводят подкожно 5 морским свинкам массой 250 – 350 г в

объеме 5 мл (по 2,5 мл в оба бока). Наличие признаков столбняка в течение 21 сут наблюдения за животными свидетельствует о присутствии в пробе столбнячного токсина.

Для производства АКДС-вакцины используют только стерильный и безопасный столбнячный анатоксин с удельной активностью не менее 1000 ЕС (или Lf) на мг белкового азота.

Дифтерийный анатоксин

При производстве дифтерийного анатоксина используют токсигенный штамм *Corynebacterium diphtheriae*, полученный и депонированный в Государственной коллекции. Микробные клетки культивируют на жидких питательных средах, обеспечивающих высокую продукцию дифтерийного токсина. Методы культивирования должны гарантировать сохранение свойств штамма и предотвращать его контаминацию. Токсинсодержащую культуральную жидкость, освобожденную от микробных клеток и продуктов их распада, проверяют на стерильность, pH и содержание токсина. Для производства дифтерийного анатоксина используют культуральную среду с активностью токсина не менее 80 Lf в 1 мл. Детоксикация дифтерийного токсина должна обеспечивать сохранение антигенной активности анатоксина и гарантировать его безопасность: отсутствие остаточной токсичности (специфическая безопасность) и реверсии токсических свойств. Для характеристики очищенного дифтерийного анатоксина определяют его pH, специфическую (антигенную) активность, содержание общего и белкового азота, антигенную чистоту (удельную активность). Дифтерийный анатоксин должен быть очищен от примесей, вызывающих побочные реакции при введении человеку.

Определение специфической безопасности дифтерийного анатоксина. Морским свинкам (5 животным) массой 250 – 350 г вводят подкожно 1500 Lf (суммарно в оба бока) дифтерийного анатоксина. В течение 42 сут наблюдения у животных не должны обнаруживаться

изъязвления, инфильтраты, абсцессы, некрозы на местах инъекции и потеря массы тела. Если наблюдается гибель хотя бы 1 животного от дифтерийной интоксикации (красные надпочечники при аутопсии погибших животных), дифтерийный анатоксин применению не подлежит. Если наблюдают гибель более 1 животного по причине, не связанной с дифтерийной интоксикацией, испытание повторяют. Если при повторном испытании устанавливают гибель более 1 животного, дифтерийный анатоксин считают не прошедшим испытание.

Реверсия токсичности дифтерийного анатоксина. Готовят раствор, содержащий дифтерийный анатоксин, консервант (при его наличии) в 0,9 % растворе натрия хлорида в концентрации, принятой для готового продукта. Полученную смесь делят на 2 части и выдерживают в течение 42 сут: первую – при температуре (37 ± 1) ºС, вторую – при температуре от 2 до 8 ºС. По 0,1 мл каждого образца вводят внутрикожно 2 морским свинкам массой 250 – 350 г или 1 кролику массой (2,5 ± 0,5) кг в объеме 0,2 мл. Наличие реакций на месте инъекции в течение 4 сут наблюдения свидетельствует о присутствии во введенном растворе дифтерийного токсина (реверсии токсичности).

Для производства АКДС-вакцины используют только стерильный и безопасный дифтерийный анатоксин, содержащий не менее 1500 Lf на мг белкового азота.

Инактивированная коклюшная суспензия

Инактивированная коклюшная суспензия (КС) представляет собой стерильную взвесь обезвреженных формальдегидом цельных микробных клеток *Bordetella pertussis.* Для производства КС используют штаммы, полученные и депонированные в Государственной коллекции. Производство ЕС должно быть основано на системе посевных серий. Культуры рабочих посевных серий должны обладать теми же характеристиками, что и культуры штамма, из которого была получена исходная посевная серия. Ежегодно перед использованием в производстве посевные серии должны быть

проверены по морфологии, культуральным и антигенным свойствам, дермонекротической активности, вирулентности и токсичности, а также иммуногенной активности.

Определение серологических (антигенных) свойств КС. Взвесь коклюшных микробных клеток должна содержать агглютиногены 1, 2 и 3. Уровень агглютиногенов должен выявляться в реакции агглютинации соответствующими адсорбированными агглютинирующими сыворотками в титре не ниже 1:1280. При производстве КС используют штаммы *Bordetella pertussis* (серотип 1.2.3 – 1 штамм, серотип 1.2.0 – 1 штамм, серотип 1.0.3 – 1 штамм), взятые в равных соотношениях или в соотношении 4:3:3. Содержание формальдегида в инактивированной КС не более 300 мкг/мл, тиомерсала (при его наличии) – от 85 до 115 мкг/мл.

Уровень агглютиногенов 1, 2 и 3 следует определять на стадии получения сведенной КС и перед добавлением адъюванта или объединением с другими компонентами (антигенами) комбинированных вакцин. Для определения уровня содержания агглютиногенов используют адсорбированные коклюшные сыворотки к агглютиногенам 1, 2, 3. Титром считают величину, соответствующую последнему удвоенному разведению сыворотки, дающему агглютинацию, соответствующую +++.

Для постановки развернутой РА готовят двукратные разведения сывороток от 1:160 до 1:10240 в 0,9 % растворе натрия хлорида, pH (7,1 ± 0,2). Для этого в ряд агглютинационных пробирок, за исключением первой, наливают по 0,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, pH (7,1 ± 0,2). Затем в первую и вторую пробирки вносят по 0,5 мл сыворотки в разведении 1:160. После тщательного перемешивания содержимого переносят 0,5 мл полученного разведения 1:320 из второй пробирки в третью, получая разведение 1:640, из третьей пробирки 0,5 мл переносят в четвертую и т.д. Из последней пробирки ряда, содержащей предельное разведение сыворотки (1:10240), 0,5 мл удаляют в емкость с дезинфицирующим раствором для

получения равных объемов разведенной сыворотки (по 0,5 мл) во всех опытных пробирках.

Во все пробирки с приготовленными двукратными разведениями сывороток вносят по 0,5 мл испытуемой микробной взвеси с мутностью 10 МЕ (за 1 МЕ условно принят 1,1 млрд коклюшных бактерий в 1 мл). Одновременно проводят контроль сыворотки и антигена в тех же объемах на отсутствие спонтанной агглютинации, смешивая:

– 0,5 мл сыворотки в разведении 1:160 с 0,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, pH (7,1 ± 0,2);

– 0,5 мл микробной взвеси КС с 0,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, pH (7,1 ± 0,2).

Содержимое пробирок перемешивают путем встряхивания штатива, который затем помещают на 2 ч в термостат при температуре (36 ± 1) °С, после чего оставляют на 18–20 ч при температуре (5 ± 3) °С.

Результаты реакции агглютинации учитывают визуально до встряхивания пробирок, а затем для более точного учета – в агглютиноскопе при осторожном встряхивании осадка путем медленного наклона пробирки.

Учет результатов реакции проводят по «четырехкрестовой» системе:

«++++» – полная агглютинация: обильный плотный осадок, четко сформирован «зонтик», полное просветление надосадочной жидкости; после легкого встряхивания – крупные хлопья в прозрачной надосадочной жидкости;

«+++» – осадок большой, рыхлый, надосадочная жидкость еще прозрачна, слегка опалесцирует; после легкого встряхивания – средние хлопья в слегка опалесцирующей надосадочной жидкости;

«++» – мелкие, нестойкие хлопья, осадок небольшой, рыхлый, надосадочная жидкость непрозрачна; после легкого встряхивания – мелкие, нестойкие хлопья;

«+» – следы агглютинации: в центре небольшой осадок, надосадочная

жидкость непрозрачная;

«–» – отрицательная реакция: осадка нет или небольшой компактный осадок в центре дна пробирки, взвесь равномерно мутная.

Определение специфической безопасности инактивированной КС. Полноту инактивации коклюшных микробов (специфическую безопасность) определяют в опытах на животных.

Испытуемую КС вводят внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл, содержащем 10 млрд коклюшных бактерий (прививочная доза вакцины для человека) 10 беспородным белым мышам массой 14 – 16 г. Мышам контрольной группы (10 животных) внутрибрюшинно вводят по 0,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, pH (7,0 ± 0,3), содержащего в той же концентрации консервант, который присутствует в вакцине. Для испытания используют здоровых животных одного пола из одной партии. Если используют животных обоего пола, их следует равномерно распределить по группам. Непосредственно перед введением вакцины определяют общую массу каждой группы мышей. Через 72 ч и спустя 7 сут после введения определяют общую массу каждой группы мышей. Вакцина считается безопасной, если:

а) через 72 ч общая масса тела опытных животных не ниже их исходной массы тела перед введением препаратов;

б) через 7 сут относительный прирост массы тела мышей, получивших испытуемую коклюшную суспензию, составляет не менее 60 % прироста массы тела контрольных животных.

В случае гибели за этот срок хотя бы 1 мыши или потери в массе тела, по сравнению с первоначальной, опыт повторяют на удвоенном количестве мышей с теми же требованиями. В случае гибели хотя бы 1 мыши при повторном контроле испытуемая вакцинная масса признается непригодной.

Определение дермонекротической активности. Испытание проводят на кроликах или мышах-сосунках. Коклюшная суспензия в концентрации 4 МЕ в объеме 0,2 мл при внутрикожном введении кролику не должна

вызывать образования инфильтратов и развития некрозов; допускается гиперемия не более 10 мм в диаметре. В качестве контроля используют введение живой культуры в объеме 0,2 мл с минимальной концентрацией микробных клеток, вызывающей некроз размером не менее 5 мм в диаметре. Определение проводят на 2 белокожих кроликах массой 1,5–2 кг. Учет результатов проводят ежедневно в течение 4 сут.

КС, содержащая 1 МЕ в объеме 0,05 мл, при подкожном введении четырехдневным мышам-сосункам в область шеи со стороны спины не должна вызывать изменения цвета кожных покровов. В качестве положительного контроля вводят живую коклюшную культуру, взятую в том же объеме с минимальной концентрацией микробных клеток, вызывающей кожную реакцию; в качестве отрицательного контроля – 0,05 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Каждый препарат вводят 2 животным. Реакцию учитывают в течение 24 ч. Появление сине-пурпурного окрашивания инъецированной области свидетельствует о присутствии недостаточно обезвреженного дерматонекротического токсина.

Для обоих тестов в качестве положительного контроля используют живую 2-суточную культуру тест-штамма или производственного (не подвергнутого инактивации) штамма, выращенную на среде Борде-Жангу с 30 % крови человека или КУА с 10 % крови человека.

Определение иммуногенных (защитных) свойств КС. КС с мутностью 20 МЕ должна содержать 10 МЕ активности. Определение проводят в соответствии с ОФС «Иммуногенность коклюшной суспензии и цельноклеточного коклюшного компонента комбинированных вакцин».

Для производства вакцины используют КС с концентрацией клеток от 60 до 80 МЕ в 1 мл, pH 6,8–7,4.

Показатели, которые влияют на качество, но не могут быть определены в конечном продукте, должны быть проверены на промежуточных стадиях производства, что должно быть отражено в нормативной документации.

Прививочная доза АКДС-вакцины (0,5 мл) содержит 15 Lf дифтерийного анатоксина, 5 ЕС (Lf) столбнячного анатоксина и 10 млрд клеток инактивированных коклюшных бактерий. В состав лекарственного средства может входить антимикробный консервант.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Опалесцирующая жидкость белого цвета, которая может иметь сероватый или желтоватый оттенок. При отстаивании разделяется на рыхлый осадок белого или белого с сероватым или желтоватым оттенком цвета, легко диспергируемый при встряхивании, и прозрачную надосадочную жидкость. Испытания проводят визуально в проходящем свете.

Подлинность. Должна обладать специфической (иммуногенной) активностью, обеспечивая защиту от действия дифтерийного и столбнячного токсинов и коклюшных микробов. Определение проводят методами летального заражения, изложенными в разделе «Специфическая активность» ОФС «Иммуногенность адсорбированного столбнячного анатоксина», ОФС «Иммуногенность адсорбированного дифтерийного анатоксина» и ОФС «Иммуногенность коклюшной суспензии и цельноклеточного коклюшного компонента комбинированных вакцин». В нормативной документации производителя могут быть указаны альтернативные методы, подтверждающие наличие в лекарственном средстве дифтерийного и столбнячного анатоксинов, а также коклюшного компонента, обладающих антигенной активностью.

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

Размер частиц (дисперсность). Должна свободно проходить в шприц через иглу № 0840, если нет других указаний в нормативной документации производителя. Определение проводят в соответствии с ОФС

Федеральный электронный медицинский библиотека ФЭМБ

«Инъекционные лекарственные формы. Лекарственные средства для парентерального применения».

Время седиментационной устойчивости. После встряхивания и получения гомогенной взвеси не должно наблюдаться полного расслаивания в течение не менее 1 мин, если нет других указаний в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Инъекционные лекарственные формы. Лекарственные средства для парентерального применения».

pH. От 6,8 до 7,4, если в нормативной документации производителя нет иных указаний. Испытания проводят потенциометрическим методом с неразведенной АКДС-вакциной в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Стерильность. Должна быть стерильной. Испытание проводят методом прямого посева в соответствии с ОФС «Стерильность». Для контроля используют тиогликолевую среду. Посевы инкубируют при температуре 30–35 и 20–25 °С.

Аномальная токсичность. Должна быть нетоксичной. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Белым мышам массой 14–16 г препарат вводят внутрибрюшинно по 0,5 мл, морским свинкам – подкожно по 3 мл (по 1,5 мл в оба бока). За животными наблюдают 7 сут. В течение указанного времени не должны наблюдаться гибель животных и потеря массы тела.

Специфическая безопасность. Должна быть безопасной (дифтерийный и столбнячный компоненты) при подкожном введении 5 морским свинкам массой 250–350 г 6 прививочных доз для человека (суммарно в бок и лапку). Через 30 дней все животные должны остаться живыми без симптомов столбняка, дифтерийной интоксикации и потери массы тела. В случае гибели 1 из животных или потери массы тела от неспецифических причин испытание повторяют. Если при повторном

испытании гибнет более 1 животного, лекарственный препарат признают не соответствующим требованиям.

Специфическую безопасность коклюшного компонента оценивают аналогично методу, описанному для определения специфической безопасности коклюшной суспензии.

Специфическая (иммуногенная) активность. Специфическая активность 1 мл вакцины должна быть не менее 8 международных единиц (МЕ) для коклюшного (нижний предел значения доверительного интервала (P = 0,95) не менее 4 МЕ/мл), 60 МЕ для дифтерийного и 120 МЕ для столбнячного компонентов. Специфическую активность дифтерийного и столбнячного анатоксинов, входящих в состав вакцины, определяют по устойчивости иммунизированных животных к заражению соответствующими токсинами в соответствии с ОФС «Иммуногенность адсорбированного дифтерийного анатоксина» и ОФС «Иммуногенность адсорбированного столбнячного анатоксина». Специфическую активность коклюшного компонента вакцины определяют на модели экспериментального менингоэнцефалита при внутримозговом введении иммунизированным мышам заражающей дозы тест-штамма *Bordetella pertussis* в соответствии с ОФС «Иммуногенность коклюшной суспензии и цельноклеточного коклюшного компонента комбинированных вакцин».

Специфическую активность дифтерийного и столбнячного компонентов возможно оценивать по титру соответствующих антител в сыворотке крови иммунизированных животных в тестах с параллельным использованием стандартных образцов, калиброванных в МЕ.

Полнота сорбции. В 1 мл надосадочной жидкости содержание неадсорбированного дифтерийного анатоксина не должно превышать 1 Lf, неадсорбированного столбнячного анатоксина – 0,1 ЕС/Lf, если в нормативной документации нет иных указаний. Полноту сорбции определяют путем индикации неадсорбированных дифтерийного и

столбнячного анатоксинов в надосадочной жидкости АКДС-вакцины. Определение содержания неадсорбированного дифтерийного анатоксина в надосадочной жидкости проводят в соответствии с ОФС «Определение концентрации анатоксинов/токсинов в реакции флокуляции», неадсорбированного столбнячного анатоксина – в соответствии с ОФС «Определение концентрации анатоксинов в реакции антитоксинсвязывания».

Формальдегид. Не более 100 мкг/мл. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение формальдегида в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Производственные штаммы микроорганизмов. Раздел должен содержать следующую информацию: наименование штаммов; место их депонирования; допустимое количество пассажей (при необходимости) и методику их проведения с указанием условий культивирования; при необходимости — дополнительные к паспортным данным требования к характеристикам штаммов.

Консерванты (при наличии). Концентрация антимикробных консервантов должна быть не ниже минимально эффективной и не превышать указанную на этикетке более чем на 15%. В качестве консерванта используют тиомерсал. Определение проводят колориметрическим или атомно-абсорбционным методом в соответствии с ОФС «Количественное определение тиомерсала в иммунобиологических лекарственных препаратах». Не рекомендуется использование консервантов при производстве лекарственных препаратов, выпускаемых в однодозовой расфасовке.

Сорбенты. Алюминия гидроксид. Не более 1,1 мг/мл алюминия(III), если в нормативной документации производителя нет иных указаний. Определение проводят комплексонометрическим методом в соответствии с ОФС «Определение ионов алюминия в сорбированных иммунобиологических лекарственных препаратах».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты». На первичную упаковку наносят дополнительное указание «Встряхивать!». На вторичную потребительскую упаковку наносят дополнительные указания «Перед употреблением встряхивать», «Замораживание не допускается».

Транспортирование и хранение. Транспортирование и хранение при температуре от 2 до 8 °С.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Вакцина бруцеллезная живая **ФС.3.3.1.0011.15**

Взамен ГФ X, ст.718,

ФС 42-3177-95

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину бруцеллезную живую, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и накожного скарификационного нанесения, представляющую собой культуру живых микробов бруцеллезного вакцинного штамма *Brucella abortus* 19 BA, высушенную методом лиофилизации в стабилизирующей среде. Вакцина предназначена для профилактики бруцеллеза и обеспечивает развитие иммунитета продолжительностью 10–12 мес, с сохранением максимальной напряженности иммунитета в течение 5–6 мес.

ПРОИЗВОДСТВО

Все этапы производства вакцины должны гарантировать соблюдение установленных надлежащих правил, а также качества лекарственного препарата, гарантирующее его безопасность для человека.

Вакцинный штамм *Brucella abortus* 19 BA, биовар I должен иметь типичные культуральные, морфологические, биохимические и антигенные свойства; не содержать бактериофага; остаточная вирулентность для белых мышей массой (19 ± 1) г должна быть в пределах инфицирующих доз (ID_{50}) от 5 10^2 до $5 \cdot 10^5$ микробных клеток (м.к.); быть безопасным: при подкожном введении белым мышам массой (19 ± 1) г дозы $2 \cdot 10^9$ м.к не вызывать их гибель в течение 6 сут наблюдения; при введении морским свинкам

Федеральная электронная медицинская библиотека

подкожно дозы $2 \cdot 10^9$ м.к/мл через 14 сут должен определяться от $5 \cdot 10^2$ до $5 \cdot 10^4$ м.к./мл в 1 мл взвеси селезенки; быть иммуногенным: предохранять от заражения вирулентным штаммом *B. melitensis* 565 не менее 7 из 10 морских свинок, привитых подкожно $2 \cdot 10^9$ живых м.к./мл.

Перед приготовлением производственной культуры *B. abortus* 19 ВА проводят пассаж штамма через организм морской свинки с последующим отбором типичных колоний, выросших на плотной питательной среде из посевов селезенки или регионарных лимфатических узлов.

Технология производства вакцины бруцеллезной живой предусматривает получение посевных культур *B. abortus* 19 ВА I, II, III и IV генераций; процесс накопления биомассы, выращенной для приготовления микробной взвеси с необходимой концентрацией; последующий розлив, замораживание, сублимационное высушивание, герметизацию и упаковку препарата. В зависимости от технологии приготовления вакцины в процессе производства используются стабилизаторы, разрешенные для использования при производстве иммунобиологических лекарственных препаратов: сахароза, желатин, тиомочевина, натрия глутамат моногидрат.

На стадиях приготовления посевных культур определяют pH, концентрацию м.к., отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов, проводят контроль посевных культур на диссоциацию, отсутствие бактериофага и дифференциацию по чувствительности бруцелл к анилиновым красителям (тест бактериостатического действия анилиновых красок).

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Пористая масса белого или белого с желтоватым оттенком цвета.

Восстановленный препарат – гомогенная мутная суспензия белого или белого с желтоватым оттенком цвета без посторонних примесей, осадка или хлопьев. Определение проводят визуально.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Подлинность. Должна содержать чистую культуру вакцинного штамма бруцеллезного микроба. Определение проводят иммунофлуоресцентным методом (РИФ) с помощью иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих бруцеллезных, меченных ФИТЦ, в соответствии с инструкцией по применению. В мазках из вакцины должно наблюдаться специфическое ярко-зеленое свечение по периферии микробных клеток.

Время растворения. Должна полностью растворяться в течение 1 мин при добавлении 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида.

pH. От 6,8 до 7,2. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия». Для испытания используют 20 ампул, содержимое каждой ампулы растворяют в 1 мл воды для инъекций.

Время седиментационной устойчивости. Суспензия не должна расслаиваться в течение 5 мин. Определение проводят в соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

Размер частиц. Суспензия должна свободно проходить в шприц через иглу № 0840. Определение проводят в соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

Потеря в массе при высушивании. Не более 3,0 %. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Средняя масса и отклонение от средней массы. Коэффициент вариации массы вакцины в ампулах должен быть не более 5 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов. Вакцина не должна содержать посторонних микроорганизмов и грибов. В препарате должна содержаться живая чистая культура вакцинного штамма бруцелл. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методом прямого посева на тиогликолевую среду.

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

За 1 образец принимают содержимое 2 ампул с препаратом. В ампулы вносят по 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, перемешивают и по 1 мл каждого образца высевают в пробирки, содержащие по 20 мл тиогликолевой среды. Одну пробирку из каждого образца инкубируют при температуре от 30 до 35 °С для выявления аэробных и анаэробных микроорганизмов, другую – при температуре от 20 до 25 °С для выявления грибов. Через 5 – 7 сут из каждой пробирки производят пересев по 0,5 мл в 2 пробирки, содержащие 10 мл тиогликолевой среды. Все пробирки выдерживают после пересева при соответствующих температурных режимах до 14 сут со дня первичного посева. Через 14 сут из всех пробирок делают мазки, окрашивают по Граму, просматривают под микроскопом при увеличении 90×10.

В случае обнаружения хотя бы в 1 из 10 просмотренных полей зрения кокков или грамположительных палочек препарат считается контаминированным посторонней микрофлорой.

При выявлении в мазках грамотрицательных палочек, отличающихся по морфологии от бруцелл, из этого образца готовят 3 мазка, которые исследуют в реакции иммунофлуоресценции (РИФ), обрабатывая иммуноглобулинами диагностическими флуоресцирующими бруцеллезными сухими, и просматривают в каждом мазке не менее 10 полей зрения с помощью люминесцентного микроскопа. Если не все бактерии, обнаруживаемые в препарате, дают в ультрафиолетовом спектре специфическое ярко-зеленое свечение по периферии клеток (при использовании сывороток, меченых ФИТЦ), образец считают контаминированным посторонней микрофлорой. В этом случае контроль повторяют на удвоенном количестве образцов. В случае обнаружения посторонней микрофлоры при повторном посеве хотя бы в 1 пробирке вакцину считают не выдержавшей испытание.

Специфическая безопасность. Вакцина должна быть безопасной. Препарат, введенный подкожно белым мышам массой (19 ± 1) г в дозе $2 \cdot 10^9$ м.к., не должен вызывать их гибель в течение 6 сут наблюдения.

Вакцину разводят 0,9 % раствором натрия хлорида до концентрации $4 \cdot 10^9$ м.к. в 1 мл. Полученную микробную взвесь вводят подкожно 5 белым мышам массой (19 ± 1) г в объеме 0,5 мл во внутреннюю поверхность бедра.

Если погибла хотя бы 1 мышь, испытание повторяют на удвоенном количестве животных. Если при повторном контроле наблюдается гибель хотя бы 1 животного, вакцину считают не выдержавшей испытание.

Специфическая активность

1. ***Концентрация микробных клеток*** *(*ОК*).* В препарате должно содержаться $(7{,}0 \pm 3{,}0) \cdot 10^{10}$ бруцелл в 1 мл. Колебания результатов определений в отдельных ампулах серии не должны превышать 5 % от средней арифметической величины.

Количество м.к. определяют в 3 образцах. В ампулу с препаратом вносят по 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, перемешивают до получения равномерной суспензии. Вносят 0,1 мл разведенного испытуемого образца в пробирки и добавляют 0,9 % раствор натрия хлорида до достижения концентрации стандартного образца (СО) мутности, эквивалентной 10 МЕ.

Концентрацию м.к. (ОК) определяют по формуле:

$$\text{ОК} = (0{,}1 + n) \cdot 10 \cdot 1{,}7 \cdot 10^9,$$

где: 0,1 – объем растворенной вакцины, мл;

n– объем 0,9 % раствора натрия хлорида, взятый для разведения пробы, мл;

10 – постоянная величина;

$1{,}7 \cdot 10^9$ – концентрация м.к./мл для бруцелл по СО мутности, эквивалентная 10 МЕ.

2. ***Количество живых микробных клеток.*** Количество живых м.к. должно составлять не менее 60 % от общего количества микробных клеток в ампуле. Колебания результатов определений в отдельных ампулах серии не должны превышать 20 % от средней арифметической величины.

При определении содержания живых м.к. в вакцине используют концевые химически чистые пипетки и бактериологические пробирки с 0,9%

раствором натрия хлорида, которые должны быть охлаждены до температуры (4 ± 2) °С.

Испытание осуществляют одновременно с определением количества живых м.к. в стандартном образце вакцины бруцеллезной живой.

Для определения количества живых микробных клеток из приготовленных ранее образцов взвесей вакцины делают последовательные десятикратные разведения от 10^{-1} до 10^{-9}, используя для каждого разведения отдельную пипетку вместимостью 1 мл. Из разведений 10^{-8} и 10^{-9} высевают по 0,1 мл взвеси раздельно для каждого образца на 3 чашки Петри с эритрит-агаром или мясопептонным агаром.

После инкубации посевов в течение 5 сут при температуре (37 ± 1) °С подсчитывают количество выросших колоний, вычисляют среднее количество колоний для каждого разведения. К полученному числу добавляют количество нулей, равное показателю степени взятого разведения, суммируют и делят на количество посеянных разведений, т.е. на 2. Данное число увеличивают в 10 раз и получают количество живых бруцелл, содержащихся в 1 мл вакцины.

За количество живых м.к. принимают среднюю арифметическую определений количества живых клеток в 3 ампулах.

Процентное содержание живых микробных клеток вычисляют для каждой ампулы, принимая за 100 % число м.к., исходя из показателя концентрации для данной ампулы по формуле:

$$\%\ \text{живых м. к.} = \frac{\text{БК}}{\text{ОК}} \cdot 100\ \%,$$

где: БК – количество живых м.к.в 1 мл;

ОК – общая концентрация м.к.

3. ***Количество накожных доз.*** В ампуле должно содержаться от 4 до 10 накожных доз. Количество прививочных доз в ампуле устанавливается

Федеральная электронная медицинская библиотека

путем деления среднего (по 3 ампулам) количества живых м.к./мл на 10^{10} м.к., составляющих 1 накожную прививочную дозу.

4. ***Иммуногенность.*** Не менее 7 из 10 морских свинок, привитых подкожно дозой $2 \cdot 10^9$ живых бруцелл в 1 мл, должны быть предохранены от заражения 2 минимальными заражающими дозами вирулентного штамма *B. melitensis* 565. Одна минимальная заражающая доза *B. melitensis* 565 не должна превышать 10 м.к.

Иммунизируют подкожно дозой $2 \cdot 10^9$ живых м.к. в объеме 1 мл вакцины 10 морских свинок массой (350 ± 50) г любого пола. Через 28 – 30 сут иммунизированных и 3 неиммунизированных (контрольных) животных заражают подкожно путем введения 2 инфицирующих доз вирулентного штамма *B. melitensis* 565 в объеме 1 мл. Параллельно проверяют количество живых бруцеллезных бактерий в дозе для заражения, делая высев из разведения 10^{-7} по 0,1 мл на 3 чашки Петри с эритрит-агаром или мясопептонным агаром. Через 6 – 7 сут инкубации посевов при температуре (37 ± 1) °С на каждой чашке Петри должно вырасти не менее 2 колоний.

Иммунизированных и контрольных морских свинок через 28 – 30 сут подвергают эвтаназии и вскрывают. Печень, селезенку, лимфоузлы (паховые, парааортальные, шейные) помещают в стерильную чашку Петри. Каждый орган надсекают ножницами, берут уколом стерильной деревянной палочкой и вносят в пробирку со скошенным печеночным агаром или агаром Альбими, тщательно втирая материал в поверхность агара. Затем посевной материал вносят в пробирки с эритрит-бульоном. Для посева каждого органа используют отдельную палочку.

Выросшие колонии бруцелл петлей высевают на среды с анилиновыми красками. Через 7 сут инкубации посевов при температуре (37 ± 1) °С выделенные культуры дифференцируют по редуцирующей способности бруцелл к анилиновым краскам и образованию сероводорода. *B. abortus* растет только на средах с фуксином, *B. melitensis* – в присутствии фуксина и тионина.

При выращивании культуры бруцелл только в бульоне ее пересевают на питательный агар и затем идентифицируют.

Не менее чем у 7 морских свинок, иммунизированных вакциной, при высевах из органов не должно быть роста *B. melitensis*. У всех контрольных (неиммунизированные) морских свинок должно быть обнаружено инфицирование, т.е. выделение *B. melitensis* из паренхиматозных органов (печень, селезенка) и лимфоузлов. В случае если вакцина защищает меньшее количество морских свинок, опыт повторяют по той же методике и на том же количестве животных в сравнении со стандартным образцом вакцины бруцеллезной живой. Если при повторном контроле стандартный образец предохраняет от заражения при введении 2 минимальных доз вирулентного штамма *B. melitensis* 565 не менее чем 7 из 10 иммунизированных свинок, а испытываемая – меньшее количество морских свинок, препарат считают не выдержавшим испытание.

Термостабильность. Не менее 7 сут. Показатель термостабильности (срок, в течение которого в препарате сохраняется 50 % живых микробных клеток по отношению к первоначальному количеству) определяют в 3 образцах после хранения вакцины при температуре (37 ± 1) °С в течение 14 сут.

Методика определения количества живых м.к. изложена в разделе «Специфическая активность».

Показатель термостабильности (t), выраженный в сут, рассчитывают по формуле:

$$t = \frac{0{,}3 \cdot 14}{\lg A_0 - \lg A_n},$$

где: $\lg A_0$ – логарифм первоначального количества живых м.к./мл;

$\lg A_n$ – логарифм количества живых м.к./мл через 14 сут хранения вакцины при температуре (37 ± 1) °С;

0,3 – постоянная величина;

14 – срок хранения вакцины при температуре (37 ± 1) °С, сут.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС

«Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Вакцина брюшнотифозная	**ФС.3.3.1.0012.15**
	Взамен ГФ X, ст.724,
Ви-полисахаридная	**ФС 42-60ВС-87**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину брюшнотифозную Ви-полисахаридную, представляющая собой раствор капсульного полисахарида, извлеченного из супернатанта культуры *Salmonella typhi*.

Вакцина брюшнотифозная Ви-полисахаридная предназначена для профилактики брюшного тифа.

ПРОИЗВОДСТВО

Производственный штамм *Salmonella typhi* должен отвечать следующим требованиям:

– на плотной питательной среде образовывать круглые, гладкие, выпуклые, блестящие колонии (S-формы);

– на висмут-сульфитном агаре образовывать черные блестящие колонии;

– в мазках, окрашенных по Граму, должны присутствовать грамотрицательные палочки с закругленными концами;

– должен ферментировать глюкозу, маннит и мальтозу с образованием кислоты без газа;

– должен продуцировать сероводород;

– не должен ферментировать лактозу и сахарозу;

– не должен образовывать индол;

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

– LD_{50} производственного штамма должна быть не более 20 микробных клеток при внутрибрюшинном введении в 5 % муцине третьего типа белым беспородным мышам массой 16 – 20 г.

Технология получения вакцины брюшнотифозной Ви-полисахаридной предусматривает культивирование производственного штамма (штамма-продуцента) в жидкой синтетической питательной среде; получение биомассы и ее дезактивацию; выделение из полученной биомассы капсульного неочищенного Ви-полисахарида и его лиофилизацию; очистку Ви-полисахарида и лиофилизацию очищенного Ви-антигена; получение готовой формы препарата.

На этапе культивирования используют синтетическую питательную среду. Полученную биомассу контролируют на бактериологическую чистоту и типичность морфологии. Инактивацию проводят фенолом, по окончании процесса оценивают специфическую стерильность биомассы методом посева селективные питательные среды.

Полученную инактивированную культуральную жидкость центрифугируют, супернатант подвергают концентрированию и диализу. Концентрат Ви-антигена лиофилизируют, полученный после лиофилизации неочищенный Ви- полисахарид контролируют по массе и определяют Ви- и О-специфическую активность. Этап очистки предусматривает очистку от нуклеиновых кислот, балластных белков и диализ Ви-антигена.

Лиофильно высушенный препарат очищенного Ви-антигена представляет собой субстанцию для приготовления готовой формы препарата.

СУБСТАНЦИЯ ОЧИЩЕННОГО Ви-АНТИГЕНА

Описание. Белый аморфный порошок.

Подлинность. Оценивается в реакции преципитации в геле по Оухтерлони с монорецепторной Ви-сывороткой (подраздел «Подлинность» раздела «Испытания»). Линия преципитации 0,01 % раствора субстанции должна быть идентичной линии преципитации стандартного образца (СО).

Федеральный ЦМБ медицинской библиотеки электронной

Белок. Не более 1,0 %. Определение проводят по методу Лоури без предварительного осаждения белка в соответствии с ОФС «Определение белка» и ОФС «Определение белка колориметрическим методом (метод Лоури) в иммунобиологических лекарственных препаратах». Субстанцию предварительно растворяют в воде очищенной до концентрации 5,0 мг/мл.

Нуклеиновые кислоты. Не более 2,0 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение нуклеиновых кислот по методу Спирина в иммунобиологических лекарственных препаратах». Субстанцию предварительно растворяют в воде очищенной до концентрации 1,0 мг/мл.

О-ацетильные группы. Не менее 2,0 мкмоль/мг. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение О-ацетильных групп в полисахаридных вакцинах». Субстанцию предварительно растворяют в воде очищенной до концентрации 1,0 мг/мл.

Молекулярные параметры. Не менее 50 % полисахарида должно элюироваться в объеме до коэффициента распределения K_d = 0,25. Определение проводят методом гель-фильтрации с использованием сефарозы. Через колонку длиной около 0,4 м, с внутренним диаметром 9 мм, уравновешенную 0,2 М раствором натрия хлорида пропускают около 0,9 мг полисахарида в объеме 0,5 мл и элюируют со скоростью около 14 мл/ч. Фракции регистрируют с помощью ультрафиолетового детектора при длине волны 206 нм. Выход полисахарида оценивают по площади пиков до и после K_d = 0,25.

Калибрование колонки. Определяют полный (V_t) и свободный (V_o) объемы колонки с помощью калибровочных растворов голубого декстрана и натрия азида в условиях, описанных выше.

Вычисляют объем выхода фракций в мл (V_e), соответствующий K_d = 0,25 по формуле:

$$V_e = V_0 + 0{,}25(V_t - V_0),$$

где: V_0 – свободный объем колонки (объем выхода голубого декстрана), мл;

V_t – общий объем колонки (объем выхода натрия азида), мл;

0,25 –коэффициент распределения вещества (K_d).

Рассчитывают значение V_e в мм по формуле и находят на хроматограмме:

$$V_e = \frac{V_e(\text{мл}) \cdot V_t(\text{мм})}{V_t(\text{мл})}.$$

Пики, элюирующиеся до и после K_d = 0,25 (значение V_e на хроматограмме, мм), интегрируют вручную.

Содержание полисахарида (А) в субстанции вакцины, элюированного до Kd = 0,25, выраженное в процентах, определяют по формуле:

$$A = \frac{S_1}{(S_1 + S_2)} \cdot 100\ \%,$$

где: S_1 – площадь пика, элюировавшегося до Kd = 0,25;

S_2 – суммарная площадь пиков, элюировавшихся до и после K_d = 0,25.

Определение молекулярных параметров можно проводить с помощью валидированного метода эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография» раздел «Эксклюзионная хроматография».

Примечания.

1. Приготовление испытуемого раствора. Растворяют 0,9 ± 0,050 мг полисахарида в 0,5 мл 0,2 М раствора натрия хлорида. Полученный раствор перемешивают на шейкере в течение 2 мин. Раствор готовят непосредственно перед использованием.
2. Приготовление 0,1 % раствора натрия азида. Растворяют 1 мг натрия азида в 1мл 0,2М раствора натрия хлорида. Раствор перемешивают на шейкере в течение 1 мин. Раствор готовят непосредственно перед использованием.
3. Приготовление 0,5 % раствора голубого декстрана. Растворяют 0,5 мг голубого декстрана в 0,5 мл 0,2 М раствора натрия хлорида, перемешивают на шейкере в течение 1 мин, прибавляют 40 мкл 0,1 % раствора натрия азида и снова перемешивают на шейкере.

Растворы для калибрования хроматографической колонки готовят непосредственно перед использованием.

4. Приготовление 0,2 М раствора натрия хлорида. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 500 мл воды очищенной, прибавляют 11,7 г натрия хлорида, доводят объём раствора водой до метки. Раствор

перемешивают на магнитной мешалке в течение 5 мин и хранят при температуре 4 – 8 °С в течение 1 мес.

Специфическая активность. Содержание Ви-антигена в субстанции должно быть от 70 до 130 %. Испытания проводят методом ракетного иммуноэлектрофореза (подраздел «Специфическая активность» раздела «Испытания»).

Пирогенность. Субстанция должна быть апирогенной. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Тест - доза 0,025 мкг/мл в 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида на 1,0 кг массы животного.

Аномальная токсичность. Субстанция должна быть нетоксичной. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

Готовят раствор субстанции в концентрации 100,0 мкг в 1,0 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Тест-доза для морских свинок – 1,0 мл испытуемого раствора подкожно, для мышей – 0,5 мл испытуемого раствора внутрибрюшинно.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Бесцветная прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость с запахом фенола. Определение проводят органолептически.

Подлинность. Подлинность препарата вакцины оценивают в реакции преципитации в геле по Оухтерлони. Вакцина брюшнотифозная полисахаридная должна давать дугу преципитации, идентичную СО Ви-антигена, с монорецепторной Ви-сывороткой (приготовление сыворотки указывают в нормативной документации).

Для постановки реакции пластиковую или стеклянную пластины размером 8,5 × 9,5 см заливают 12 мл 1 % геля агарозы, приготовленном на 0,9 % растворе натрия хлорида. В застывшем слое геля с помощью пробойника и специального трафарета делают лунки: одну центральную, остальные – на периферии. Диаметр лунок – 0,4 см, расстояние между ними должно быть 0,4 см. В центральную лунку вносят 15 мкл раствора монорецепторной Ви-сыворотки (титр не ниже 1:800), в периферические – по

ФЭМБ Федеральный электронный медицинский библиотека

15 мкл СО и испытуемой вакцины, а также 0,9 % раствор натрия хлорида в качестве отрицательного контроля. Затем пластину помещают во влажную камеру на 24 – 48 ч. Вакцину считают подлинной, если линия преципитации вакцины в отношении монорецепторной Ви-сыворотки идентична линии преципитации СО.

Прозрачность. Прозрачная или опалесцирующая жидкость не более эталона I. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Цветность. Бесцветная жидкость. Определение проводят визуально в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH. От 6,7 до 7,3. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Стерильность. Вакцина должна быть стерильна. Испытания проводят методом прямого посева в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность. Вакцина должна быть апирогенной. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Готовят разведение испытуемого образца с помощью апирогенного 0,9 % раствора натрия хлорида до конечной концентрации 0,025 мкг/мл. С этой целью к 0,1 мл испытуемого образца прибавляют 1,9 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и перемешивают, затем отбирают 0,1 мл разведенного образца и прибавляют 9,9 мл 0,9 % натрия хлорида. Вводят кроликам из расчета 1 мл испытуемого образца в концентрации 0,025 мкг/мл на 1 кг массы животного.

ФГБУ «Федеральная электронная медицинская библиотека»

Аномальная токсичность. Вакцина должна быть нетоксичной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Тест-доза для морских свинок – 1,0 мл подкожно; для мышей – 0,5 мл внутрибрюшинно.

Специфическая активность. Одна доза вакцины должна содержать (25 ± 7,5) мкг Ви-антигена. Определение проводят методом ракетного иммуноэлектрофореза (РИЭФ).

В химическую пробирку с 16 мл расплавленного и охлажденного до температуры 56 °С 1 % геля агарозы вносят 0,5 мл сыворотки против Ви-антигена *S.typhi* (титр не ниже 1:800) и перемешивают. Содержимое пробирки выливают на стеклянную пластинку размером 6 × 12 см, установленную на горизонтальной поверхности. Пластинка должна покрыться гелем агарозы равномерно и полностью. Толщина геля должна составлять (1,0 ± 0,1) мм. После застывания геля агарозы пластинку накладывают на трафарет и пробивают лунки пробойником диаметром 4 мм, после чего удаляют гель из лунок с помощью вакуумного насоса или иглы.

В катодную и анодную части электрофоретической камеры заливают по 800 мл разведенного трис-боратного буферного раствора (раствор 2) и охлаждают заполненную буферным раствором камеру до температуре 4 °С в холодильной установке. Охлажденную камеру вынимают и помещают в нее пластину таким образом, чтобы край пластины с лунками находился у анодной части.

Электродные мостики для соединения гелевой пластины с буферным раствором готовят из 4 слоев фильтровальной бумаги размером 6 × 12 см. С их помощью соединяют поверхность агарозы с трис-боратным буферным раствором. Расстояние от края мостика до лунок должно быть не менее 15 мм. В лунки последовательно вносят по 15 мкл раствора СО Ви-антигена с концентрацией 5; 10; 15; 20 мкг/мл для построения калибровочного графика и испытуемый образец вакцины, предварительно разведенный в 5 раз. Проводят электрофорез при напряжении 180 –200 В при постоянной силе

тока 10 мА в течение 4 ч. Каждую пробу вносят в 2 лунки. Время от начала нанесения образцов до включения прибора не должно превышать 10 мин. Пластинку переносят в кювету с 0,9 % раствором натрия хлорида и выдерживают 15 – 20 ч при температуре 18 – 20 °С для отмывания от сыворотки. После этого пластинку вынимают, накрывают фильтровальной бумагой, прокалывают бумагу иглой над лунками и сушат на воздухе при температуре 18 – 20 °С. После высушивания геля агарозы пластинку с гелем переносят в кювету с красителем на 20– 25 мин, а затем в кювету с раствором для обесцвечивания окрашенных гелей на 15–20 мин, далее промывают в водопроводной воде и сушат при температуре 18 – 20 °С.

По окончании процедуры измеряют высоту пика (h) от края лунки до внешнего края пика. Строят калибровочный график, откладывая по оси абсцисс концентрации Ви-антигена, а по оси ординат – высоту пика («ракеты») СО. По калибровочной кривой находят концентрацию Ви-антигена в испытуемом образце с учетом предварительного разведения. Содержание Ви-антигена (*X*) в процентах рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{C \cdot 100}{50},$$

где: С – концентрация Ви-антигена в испытуемом образце, найденная по калибровочному графику, с учетом предварительного разведения, мкг/мл;

50 – среднее номинальное значение содержания Ви-антигена в 1 мл анализируемой вакцины, мкг/мл.

Построение калибровочного графика. СО Ви-антигена разводят, исходя из аттестованного значения, до концентрации 20 мкг/мл в соответствии с инструкцией по применению. К 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 мл прибавляют воду очищенную до конечного объема 0,4 мл (концентрация Ви-антигена в полученных растворах 5; 10; 15; 20 мкг/мл соответственно). В пробирку, содержащую 0,4 мл раствора СО, воду очищенную не добавляют. Растворы используют свежеприготовленными.

Примечания.

1. Приготовление испытуемого раствора. Испытуемый образец анализируемой вакцины разводят в 5 раз. Для этого к содержимому ампулы добавляют 2,0 мл трис-боратного буферного раствора с трилоном Б, pH 8,6 – 8,8 (раствор 3). Раствор хранят при температуре 2 – 8 °С в течение 6 мес.

2. Приготовление концентрированного трис-боратного буферного раствора с трилоном Б, pH 8,6 – 8,8 (раствор 1). В мерной колбе вместимостью 1000 мл последовательно растворяют в воде очищенной 60,5 г трис(гидроксиметил)аминометана, 6,0 г натрия эдетата (трилон Б), 19,0 г борной кислоты, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Раствор хранят при температуре 2 – 8 °С в течение 6 мес.

3. Приготовление электродного разведенного трис-боратного буферного раствора с трилоном Б, pH 8,6 – 8,8 (раствор 2). В мерную посуду вместимостью 2,0 л помещают 320 мл концентрированного трис-боратного буферного раствора, прибавляют 1280 мл воды очищенной и перемешивают. Раствор хранят при температуре 2 – 8 °С в течение 6 мес.

4. Приготовление разведенного трис-боратного буферного раствора с трилоном Б, pH 8,6 – 8,8 (раствор 3). В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 20,0 мл концентрированного трис-боратного буферного раствора (раствор 1), доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор хранят при температуре 2 – 8 °С в течение 6 мес.

5. Приготовление 1 % геля агарозы. В колбу вместимостью 250 мл помещают 2 г агарозыL и растворяют в 198 мл 0,5-кратного трис-боратного буферного раствора и перемешивают. Колбу помещают в кипящую водяную баню, прикрыв горлышко ватно-марлевой пробкой, и выдерживают при постоянном перемешивании до полного расплавления агарозы (раствор становится прозрачным, без пузырьков воздуха) в течение 1,5–2 ч. Разливают полученную смесь по 16 мл в стеклянные химические пробирки вместимостью 20 мл, пробирки выдерживают до полного застывания геля 1,0–1,5 ч при комнатной температуре. Укупоренные пробирки хранят при температуре 4 – 8 °С в течение 12 мес.

6. Приготовление красителя кумасси R. К 2 г кислотного синего 83 (кумасси бриллиантовый синий Р250), помещенного в колбу вместимостью 500 мл, прибавляют 180 мл 96 % этилового спирта, 180 мл воды очищенной, 40 мл уксусной кислоты ледяной и перемешивают. Раствор хранят в вытяжном шкафу при комнатной температуре в течение 12 мес.

7. Приготовление раствора для отмывки красителя. В колбу или градуированный стакан или цилиндр вместимостью 1 л помещают 450 мл 96 % этилового спирта, 100 мл уксусной кислоты ледяной, 450 мл воды

очищенной и перемешивают. Раствор хранят в вытяжном шкафу при комнатной температуре в течение – 12 мес.

Фенол. Не более 0,75 мг/доза. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение фенола спектрофотометрическим методом в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты». На вторичную упаковку наносится предупредительная надпись: «Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений».

Транспортирование. При температуре от 2 до 25 °С, допускается транспортирование при температуре 35 °С не более 14 сут.

Хранение. При температуре от 2 до 8 °С.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Вакцина дизентерийная против шигелл Зонне полисахаридная	**ФС.3.3.1.0013.15** **Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину дизентерийную против шигелл Зонне полисахаридную, представляющую собой раствор полисахарида, извлечённого из культуры *Shigella sonnei*, очищенного ферментативными и физико-химическими методами.

Технология получения вакцины дизентерийной против шигелл Зонне полисахаридной предусматривает культивирование производственного штамма в жидкой синтетической питательной среде, выделение из полученной биомассы неочищенного полисахарида, лиофилизацию неочищенного полисахарида, его очистку, лиофилизацию очищенного полисахарида.

Производственный штамм *Shigella sonnei* должен отвечать следующим требованиям:

– на плотной питательной среде должен образовывать круглые выпуклые колонии с ровными краями (S-формы);

– в мазках, окрашенных по Граму, должны обнаруживаться грамотрицательные палочки;

– не должен ферментировать сорбит, дульцит, глюкозу и сахарозу;

– не должен образовывать индол;

– должен расщеплять ксилозу, арабинозу, рамнозу, лактозу;

– не должен образовывать сероводород;

– вирулентность штамма при внутрибрюшинном заражении белых беспородных мышей (LD_{50}) должна быть не выше 50 млн микробных клеток;

– должен давать положительную кератоконъюнктивальную пробу на морских свинках.

ПРОИЗВОДСТВО

Технология получения вакцины дизентерийной против шигелл Зонне полисахаридной предусматривает культивирование производственного штамма в жидкой синтетической питательной среде; получение биомассы и ее дезактивацию; выделение из полученной биомассы неочищенного полисахарида (ПС); лиофилизацию неочищенного ПС и его очистку, лиофилизацию очищенного ПС и получение готовой формы препарата с соблюдением установленных требований правил организации производства и контроля качества лекарственного препарата, гарантирующих качество и безопасность для человека.

На этапе культивирования используют синтетическую питательную среду. Полученную биомассу контролируют на бактериологическую чистоту и типичность морфологии. Инактивацию проводят формалином с массовой долей формальдегида не менее (37,0 ± 0,5) %, до конечной концентрации 0,5 %. Контроль инактивации проводят методом посева на мясопептонный агар (МПА) и среду Эндо.

Полученную инактивированную культуральную жидкость центрифугируют, раствор неочищенного ПС подвергают диализу. ПС лиофилизируют, в полученном препарате ПС исследуют О-специфическую активность.

Этап очистки ПС предусматривает очистку от нуклеиновых кислот, балластных белков и диализ. Лиофильно высушенный препарат очищенного ПС – субстанция для приготовления готовой формы препарата. На стадии производства субстанцию испытывают по следующим показателям.

Описание. Белый аморфный порошок.

Подлинность. 0,01 % раствор субстанции образует 1 линию преципитации с сывороткой кроличьей против ПС *Shigella sonnei.* Определение проводят в реакции преципитации в геле по Оухтерлони с сывороткой кроличьей против ПС *S. sonnei* («Подлинность» в разделе «Испытания готового продукта»).

Белок. Не более 2,0 %. Испытания проводят по методу Бредфорда без предварительного осаждения белка в соответствии с ОФС «Определение белка». Субстанцию предварительно растворяют в воде очищенной до концентрации 5 мг/мл лиофилизата в объеме растворителя.

Нуклеиновые кислоты. Не более 2,0 %. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение нуклеиновых кислот по методу Спирина в иммунобиологических лекарственных препаратах». Субстанцию предварительно растворяют в воде очищенной до концентрации 1 мг/мл ПС в объеме растворителя.

Молекулярные параметры. Не менее 50 % ПС должно элюироваться в объеме до Kd = 0,5. Определение проводят методом гель-фильтрации («Молекулярные параметры» в разделе «Испытания готового продукта»).

Специфическая активность. 0,01 % раствор субстанции должен тормозить реакцию пассивной гемагглютинации с сывороткой диагностической к шигеллам Зонне неадсорбированной в концентрации не выше 6,25 мкг/мл; при отсутствии торможения с сывороткой диагностической к шигеллам Флекснера неадсорбированной в концентрации менее 25 мкг/мл («Специфическая активность» в разделе «Испытания готового продукта»).

Пирогенность. Субстанция должна быть апирогенной. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Тест-доза 0,050 мкг/мл в 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида на 1 кг массы животного.

Аномальная токсичность. Субстанция должна быть нетоксичной. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Готовят раствор субстанции в концентрации 100 мкг в 1 мл 0,9 % раствора

ФГБУ «ЭМБ» Федеральная электронная медицинская библиотека

натрия хлорида. Тест-доза для морских свинок – 1 мл испытуемого раствора подкожно, для мышей – 0,5 мл испытуемого раствора внутрибрюшинно.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Бесцветная прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость с запахом фенола. Определение проводят органолептически.

Подлинность. Вакцина должна образовывать 1 линию преципитации с сывороткой кроличьей против ПС *S. sonnei*. Приготовление сыворотки указывается в нормативной документации производителя. Определение проводят в реакции преципитации в геле по Оухтерлони.

Для постановки реакции пластиковую или стеклянную пластины размером 8,5 на 9,5 см заливают гелем агарозы по 12 мл на 1 пластину. В застывшем слое геля с помощью пробойника и специального трафарета делают лунки: одну центральную, остальные – на периферии. Диаметр лунок 0,4 см, расстояние между ними 0,4 см. В центральную лунку вносят по 15 мкл раствора сыворотки кроличьей против ПС *S. sonnei* (титр 1:800), в периферические – 15 мкл испытуемой вакцины. Затем пластину помещают во влажную камеру на 24 – 48 ч. Вакцину считают подлинной, если она дает 1 линию преципитации с сывороткой кроличьей против ПС *S. sonnei*.

Прозрачность. Прозрачная или опалесцирующая не более эталона 1 жидкость. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Цветность. Бесцветная жидкость. Испытания проводят визуально в соответствии с ОФС « Степень окраски жидкостей».

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH. От 6,7 до 7,3. Испытания проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Молекулярные параметры. Не менее 50 % ПС должно элюироваться в объеме до коэффициента распределения Kd = 0,5. Определение проводят валидированным методом гель-фильтрации с использованием сефарозы. Через колонку длиной около 0,4 м с внутренним диаметром 9 мм, уравновешенную 0,2 М раствором натрия хлорида, пропускают около 0,9 мг ПС в объеме 0,5 мл раствора 0,2 М натрия хлорида и элюируют со скоростью около 14 мл/ч. Фракции регистрируют при помощи ультрафиолетового детектора при длине волны 206 нм. Выход ПС оценивают по площади пиков до и после Kd = 0,5.

Калибрование колонки. Определяют полный (V_t) и свободный (V_o) объемы колонки с помощью калибровочных растворов – голубого декстрана и натрия азида в условиях, описанных выше.

Вычисление объема колонки V_e, соответствующего Kd = 0,5, проводят по формуле:

$$V_e = V_o + 0{,}5\ (V_t - V_o),$$

где: V_o – свободный объем колонки (объем элюции голубого декстрана), мл;
V_t – общий объем колонки с гелем (объем элюции натрия азида), мл;
0,5 – значение коэффициента распределения вещества (Kd) на колонке.

Пересчитывают значение V_e в мм находят на хроматограмме и рассчитывают по формуле**:**

$$V_e(мм) = \frac{V_e(мл) \cdot V_t(мм)}{V_t(мл)}.$$

Пики, элюирующиеся до и после Kd = 0,5 (значение V_e на хроматограмме, мм), интегрируют вручную.

Содержание ПС (A) в субстанции вакцины, элюировавшегося до Kd = 0,5, выраженное в процентах, определяют по формуле:

$$A = \frac{S_1}{(S_1 + S_2)} \cdot 100\%,$$

где: S_1 – площадь пика, элюировавшегося до Kd = 0,5;

S_2 – суммарная площадь пиков, элюировавшихся до и после Kd = 0,5.

Примечания.

1. Приготовление испытуемого раствора. Растворяют (0,9 ± 0,050) мг субстанции в 0,5 мл 0,2 М раствора натрия хлорида. Полученный раствор перемешивают на шейкере в течение 2 мин. Раствор готовят непосредственно перед использованием.

2. Растворы для калибровки хроматографической колонки.

А. Приготовление 0,1% раствора натрия азида. Растворяют 1 мг натрия азида в 1 мл 0,2 М раствора натрия хлорида и перемешивают на шейкере в течение 1 мин. Раствор готовят непосредственно перед использованием.

Б. Приготовление 0,1 % раствора голубого декстрана. Растворяют 0,5 мг голубого декстрана в 0,5 мл 0,2 М раствора натрия хлорида. Полученный раствор перемешивают на шейкере в течение 1 мин. Добавляют в полученный раствор голубого декстрана 40 мкл 0,1 % раствора натрия азида и быстро перемешивают на шейкере. Раствор готовят непосредственно перед использованием.

В. Приготовление 0,2 М раствора натрия хлорида. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 500 мл воды очищенной, прибавляют 11,7 г натрия хлорида, доводят до метки водой очищенной и перемешивают на магнитной мешалке в течение 5 мин. Раствор хранят при температуре 4 – 8 °С в течение 1 мес.

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Стерильность. Должна быть стерильной. Испытания проводят методом прямого посева в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность. Должна быть апирогенной. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Вакцину разводят апирогенным 0,9 % раствором натрия хлорида так, чтобы 1 мл раствора содержал по 0,050 мкг ПС и вводят кроликам из расчета 1 мл раствора вакцины (0,050 мкг) на 1 кг массы животного.

Аномальная токсичность. Должна быть нетоксичной. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Морским свинкам вводят подкожно тест-дозу вакцины в объеме 1 мл, мышам –

внутрибрюшинно тест-дозу 0,5 мл. Наблюдение за животными осуществляется ежедневно в течение 7 сут.

Специфическая активность. Вакцина должна тормозить реакцию пассивной гемагглютинации (РТПГА) с сывороткой диагностической к шигеллам Зонне неадсорбированной в концентрации не более 6,25 мкг/мл при отсутствии торможения с сывороткой диагностической к шигеллам Флекснера неадсорбированной в концентрации менее 25 мкг/мл. Оценивается в реакции торможения пассивной гемагглютинации (РТПГА).

Ингредиенты для проведения РТПГА: сыворотки диагностические к шигеллам Зонне и Флекснера неадсорбированные, диагностикум эритроцитарный шигеллезный Зонне и Флекснера антигенный, испытуемая серия вакцины Шигеллвак, стандартный образец (СО) содержания ПС.

Определение рабочего разведения шигеллезных диагностических сывороток. Рабочее разведение определяют в реакции пассивной гемагглютинации. Для постановки реакции готовят двукратные разведения сывороток в 0,9 % растворе натрия хлорида в объеме 100 мкл, начиная с разведения сывороток 1:10, в полистироловых круглодонных планшетах. В каждую из лунок прибавляют по 25 мкл соответствующего диагностикума. Планшеты встряхивают и оставляют на 1,5 – 2 ч при комнатной температуре.

Контролями являются:

1) проверка отсутствия спонтанной агглютинации диагностикума. В 2 лунки, содержащие по 50 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида, прибавляют по 25 мкл диагностикума;

2) проверка на отсутствие в испытуемой сыворотке агглютининов к эритроцитам барана. В 2 лунки планшета вносят по 50 мкл сыворотки в разведении 1:10 и прибавляют по 25 мкл 1 % взвеси несенсибилизированных формалинизированных эритроцитов барана (контрольные эритроциты).

Учет реакции производится по «четырехкрестовой» системе. Титром антител испытуемой сыворотки считается последнее разведение сыворотки, при котором наблюдается агглютинация эритроцитов интенсивностью не

менее чем на 3+ (+++), когда агглютинированы почти все эритроциты, и на их фоне определяется малозаметное кольцо из осевших неагглютинированных эритроцитов («зонтик»).

Рабочее разведение сыворотки для последующего использования в РТПГА берут на 4 разведения концентрированнее, чем исследуемый титр.

Для постановки РТПГА готовят двукратные разведения СО полисахарида и серии вакцины в 0,9 % растворе натрия хлорида в объеме 50 мкл, начиная с 100 мкг/мл ПС, в полистироловых планшетах. В каждую из лунок вносят 25 мкл сыворотки в рабочем разведении и прибавляют по 25 мкл диагностикума. Планшеты встряхивают и оставляют на 1,5 – 2 ч при комнатной температуре.

Учет результатов. Минимальная концентрация ПС, тормозящая гемагглютинацию (положительная РТПГА), должна быть не более 6,25 мкг/мл (наблюдается ярко выраженный осадок неагглютинированных эритроцитов).

Для неспецифических систем (при использовании сыворотки диагностической к шигеллам Флекснера) наблюдается отсутствие торможения в концентрации менее 25 мкг/мл.

Если полученные результаты не удовлетворяют этим условиям, или вакцина обладает неспецифической активностью, контроль повторяют. Если и при повторном контроле обнаруживают те же результаты, серию вакцины бракуют.

Фенол. Не более 0,75 мг/доза. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение фенола спектрофотометрическим методом в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

На вторичную упаковку наносится предупредительная надпись: «Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений».

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Транспортирование. При температуре от 2 до 25 °С, допускается транспортирование при температуре 35 °С не более 14 сут.

Хранение. При температуре от 2 до 8°С.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Вакцина лептоспирозная концентрированная инактивированная жидкая **ФС.3.3.1.0014.15**

Взамен ФС 42-3569-98

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину лептоспирозную концентрированную инактивированную жидкую, суспензию для подкожного введения, представляющую собой смесь инактивированных формальдегидом концентрированных культур лептоспир 4 серогрупп (*Leptospira interrogans Icterohaemorrhagiae copenhageni, L. interrogans Grippotyphosa grippotyphosa, L. interrogans Pomona mozdoc, L. interrogans Sejroe sejroe*).

Вакцина предназначена для профилактики лептоспироза и вызывает развитие специфического иммунитета продолжительностью до 1 года.

ПРОИЗВОДСТВО

Все этапы производства вакцины должны гарантировать соблюдение установленных надлежащих правил, а также качество лекарственного препарата, гарантирующее его безопасность для человека.

Технология производства вакцины лептоспирозной концентрированной инактивированной жидкой предусматривает приготовление питательной среды Терских с кроличьей сывороткой, приготовление полусинтетической среды с альбумином сыворотки крови человека; высев на питательную среду и накопление концентрированной микробной массы штаммов 4 серогрупп лептоспир; сведение стандартизованной микробной массы в вакцину; розлив и упаковку препарата. Производственные штаммы лептоспир должны расти

на питательной среде Терских с кроличьей сывороткой и полусинтетической питательной среде с альбумином сыворотки крови человека; быть подвижными; обладать типичными культуральными, морфологическими и антигенными свойствами; быть специфичными в реакции микроагглютинации (РМА) с иммунной сывороткой и иммуногенными для золотистых хомячков.

В качестве консерванта используется формальдегид.

На стадиях производства вакцины проводят определение роста лептоспир, чистоты культуры, подвижности лептоспир, концентрации микробной массы, подлинности, стерильности, специфической стерильности, безвредности, токсичности, специфической активности и содержания формалина.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Бесцветная слегка опалесцирующая жидкость с осадком, легко разбивающимся при встряхивании.

Подлинность. Вакцина должна вызывать у золотистых хомячков образование специфических антител, выявляемых в РМА со штаммами лептоспир 4 серогрупп (*L. interrogans Icterohaemorrhagiae copenhageni, L. interrogans Grippotyphosa grippotyphosa, L. interrogans Pomona mozdoc, L. interrogans Sejroe sejroe*) в титре не менее чем 1:100.

Методика проведения испытания описана в разделе «Специфическая активность».

Прозрачность. Показатель оптической плотности препарата должен быть не менее 0,03. Определение проводят фотометрическим методом. Испытуемый образец тщательно перемешивают, помещают в кювету с толщиной слоя 3 мм и измеряют оптическую плотность при длине волны 315 нм по сравнению с водой очищенной.

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH. От 7,2 до 7,6. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия». Для испытания используют содержимое 5 образцов.

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Время седиментационной устойчивости. Суспензия не должна расслаиваться в течение 5 мин. Определение проводят в соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

Размер частиц. Должна свободно проходить в шприц через иглу № 0840. Определение проводят в соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

Формальдегид. Не более 0,03 %. Определение проводят колориметрическим методом в соответствии с ОФС «Количественное определение формальдегида в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Стерильность. Должна быть стерильной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методом прямого посева.

Специфическая стерильность. Не должна содержать живых лептоспир. Определение проводят путем высева по 0,2 мл вакцины в 3 бактериологические пробирки с 7 мл фосфатно-сывороточной среды Терских.

Состав среды Терских (на 1 л):

- натрий фосфорнокислый двузамещенный – 0,85 г;
- калий фосфорнокислый однозамещенный – 0,25 г;
- вода очищенная – 950 мл;
- сыворотка крови кролика нормальная инактивированная – 50 мл.

Пробирки с посевами инкубируют при температуре (28 ± 1) °С в течение 20 сут. Затем делают из выделенных культур мазки по методике, указанной в разделе «Специфическая безопасность».

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

Просматривают не менее 30 полей зрения в темном поле микроскопа при увеличении 200×. В посевах не должны обнаруживаться живые (подвижные) лептоспиры. При обнаружении живых лептоспир хотя бы в 1 посеве препарат считают не выдержавшим испытание.

Аномальная токсичность. Должна быть нетоксичной. Вакцину вводят животным по 0,5 мл: белым мышам внутрибрюшинно, морским свинкам – подкожно. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

Специфическая безопасность. Должна быть безопасной, не содержать живых лептоспир.

Для проведения испытания используют золотистых хомячков массой (22 ± 3) г. Трем животным однократно внутрибрюшинно вводят по 0,5 мл вакцины. Наблюдение за животными ведут в течение 20 сут. К концу срока хомячков обескровливают декапитацией. Кровь используют для получения иммунной сыворотки и исследования ее в РМА при определении специфической активности вакцины. После обескровливания животных проводят их вскрытие и затем пастеровской пипеткой делают посев коркового слоя почек в бактериологические пробирки со средой Терских.

Вскрытие животных и забор материала для посева проводят при строгом соблюдении правил асептики. Посевы инкубируют в течение 7 сут в термостате при температуре (28 ± 1) °С. Затем отбирают 0,02 мл микробной взвеси и просматривают не менее 30 полей зрения в темном поле микроскопа при увеличении 200×. При обнаружении роста лептоспир хотя бы в 1 посеве вакцину считают не выдержавшей испытание.

Специфическая активность. Препарат должен обладать специфической иммуногенной активностью – вызывать у золотистых хомячков образование специфических антител, выявляемых в РМА со штаммами лептоспир 4 серогрупп в титре не менее, чем 1:100; защищать не менее 3 из 4 животных от заражения вирулентной культурой *L. interrogans Icterohaemorrhagiae copenhageni*. Трем золотистым хомячкам массой

(22 ± 3) г однократно внутрибрюшинно вводят по 0,5 мл вакцины. Через 20 сут после иммунизации животных обескровливают декапитацией. Кровь собирают во флаконы (пробирки) и инкубируют в термостате в течение 30 – 40 мин при температуре (37 ± 1) °С, затем выдерживают в холодильнике при температуре (6 ± 2) °С в течение 24 – 48 ч. Полученную иммунную сыворотку отбирают в стерильные пробирки и исследуют в РМА для выявления специфических антител к штаммам лептоспир 4 серогрупп, входящих в состав вакцины.

Проведение РМА. РМА ставят в лунках полистиролового планшета. В лунки с А1 по А4 вносят по 0,2 мл анализируемой сыворотки, разведенной 1:25 0,9 % раствором натрия хлорида. В лунки с В1 – В4 по F1 – F4 вносят по 0,1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Разведение сыворотки осуществляют автоматической пипеткой в направлении лунок от А к F (в вертикальном ряду), перенося по 0,1 мл каждого разведения в следующую в ряду лунку, получая таким образом разведения сыворотки с 1:25 до 1:800.

В качестве антигенов используют 7 – 12-суточные культуры лептоспир 4 серогрупп (*L. interrogans Icterohaemorrhagiae copenhageni, L. interrogans Grippotyphosa grippotyphosa, L. interrogans Pomona mozdoc, L. interrogans Sejroe sejroe*), выращенные на среде Терских. При нанесении 0,02 мл культуры каждой серогруппы на предметное стекло количество лептоспир должно быть не менее 100 – 150 клеток в поле зрения микроскопа при увеличении 200×.

После разведения сыворотки в каждый ряд лунок от А1 до F1, от А2 до F2, от А3 до F3 и от А4 до F4 вносят по 0,1 мл культуры лептоспир соответствующей серогруппы. После добавления антигенов получают разведение сывороток от 1:50 до 1:1600 в каждом вертикальном ряду. Одновременно проводят контроль культур: в 4 лунки (Н1, Н2, Н3, Н4) вносят по 0,1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и по 0,1 мл живой культуры лептоспир каждой серогруппы в отдельности. Планшет выдерживают в течение 1 ч при температуре (37 ± 1) °С. Из лунок планшета с определенной

серогруппой отбирают по 0,02 мл смеси сыворотки и культуры лептоспир, наносят на предметное стекло, накрывают покровным стеклом и микроскопируют в темном поле зрения при увеличении 200×.

Результаты реакции оценивают по условной «трехкрестовой системе»:

+ — 1/3 лептоспир агглютинированы;

++ — от 1/3 до 2/3 лептоспир агглютинированы;

+++ — более 2/3 или все лептоспиры агглютинированы;

контроль — агглютинация отсутствует, все клетки лептоспир находятся в свободном состоянии и полностью подвижны.

Положительной РМА с живыми культурами лептоспир 4 серогрупп считается реакция не менее чем на «+».

Тест активной защиты. Четырем золотистым хомячкам массой (22 ± 3) г однократно внутрибрюшинно вводят по 0,5 мл вакцины. Через 20 сут 4 иммунизированных и 4 неиммунизированных (контрольных) животных заражают внутрибрюшинно вирулентной культурой *L. interrogans Icterohaemorrhagiae copenhageni* с содержанием 100 – 150 лептоспир в поле зрения микроскопа (200×) в объеме 1 мл. Наблюдение за животными ведут в течение 7 сут.

В контрольной группе не менее 3 животных должны заболеть или погибнуть, 3 из 4 иммунизированных и зараженных животных не должны заболеть или погибнуть. Если выживают и гибнут менее 3 иммунизированных и зараженных животных соответственно, испытание повторяют. При получении аналогичных результатов вакцину считают не выдержавшей испытание.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С.

Вакцина менингококковая серогруппы А полисахаридная сухая	**ФС.3.3.1.0015.15** **Взамен ФС 42-3720-99**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину менингококковую серогруппы А полисахаридную сухую, представляющую собой лиофилизат очищенного капсульного полисахарида *Neisseria meningitidis* серогруппы А.

Полисахарид *Neisseria meningitidis* серогруппы А состоит из частично О-ацетилированных повторяющихся фрагментов N-ацетилманнозамина, связанных 1α-6 фосфодиэфирными связями.

ПРОИЗВОДСТВО

Технология получения вакцины менингококковой полисахаридной серогруппы А предусматривает культивирование штамма-продуцента в жидкой питательной среде Франца с последующим выделением из полученной биомассы полисахарида менингококка серогруппы А и его очисткой.

Процесс культивирования производственного штамма *N. meningitidis* должен осуществляться на плотных питательных средах, не содержащих элементов крови и других субстратов животного происхождения. Весь производственный процесс, основанный на использовании системы посевного материала и обеспечивающий стабильное получение вакцины для профилактики менингококковой инфекции серогруппы А с требуемой иммуногенностью и безопасностью для человека, должен быть валидирован.

Федеральная электронная медицинская библиотека

Посевной материал. Штамм-продуцент *N. meningitidis* должен быть охарактеризован по источнику его выделения и способности продуцировать полисахарид серогруппы А. Производственный штамм *N. meningitidis* серогруппы А должен обладать следующими свойствами:

- на питательном агаре с добавлением 20 % сыворотки крови крупного рогатого скота должен образовывать круглые, гладкие, прозрачные, бесцветные блестящие колонии с ровными краями, слегка выпуклые, мягкие по консистенции, которые легко снимаются с поверхности среды. Диаметр колоний должен быть от 0,5 до 2 мм. В косопроходящем свете колонии должны иметь ярко-оранжевую окраску с радужным свечением;

- в мазках, окрашенных по Граму, должны присутствовать грамотрицательные диплококки, расположенные парами в виде «кофейных зерен», а также тетрадами или скоплениями;

- культура тест-штамма должна быть оксидазоположительна;

- культура тест-штамма должна разлагать глюкозу и мальтозу с образованием уксусной кислоты и не должна разлагать лактозу, сахарозу и фруктозу;

- суспензия культуры тест-штамма должна вступать в реакцию агглютинации только со специфической сывороткой серогруппы А и не агглютинироваться сыворотками против других серогрупп менингококков, а также не давать спонтанную реакцию агглютинации в 0,9 % растворе натрия хлорида.

Бактериологическая чистота штамма-продуцента должна быть подтверждена посевом на чувствительные питательные среды, исследованием морфологии колоний, микроскопией мазков, окрашенных по Граму, а также постановкой реакции агглютинации со специфической и неспецифическими сыворотками.

На этапе культивирования производственного штамма с целью получения конечного объема биомассы используют жидкую полусинтетическую среду, не содержащую субстанций, которые могут

ФГБУ Федеральная электронная медицинская библиотека

осаждаться цетилтриметиламмония бромидом, а также не содержащую элементов крови или высокомолекулярных полисахаридов.

Бактериологическая чистота полученной биомассы должна оцениваться и подтверждаться методами, применяемыми для оценки чистоты штамма-продуцента. Бактериальный сбор центрифугируют и осаждают полисахарид из надосадочной жидкости добавлением цетилтриметиламмония бромида до его конечной концентрации 0,01 %, после чего следует экстракция полисахарида из цетавлон-полисахаридного комплекса раствором кальция хлорида. Полученный полисахарид хранят при температуре минус 20 °С.

Субстанцией полисахаридной менингококковой вакцины серогруппы А является полисахарид, очищенный от нуклеиновых кислот, белка и липополисахарида путем ступенчатого фракционирования этанолом и экстракцией фенолом. Очищенную субстанцию сушат в эксикаторе до постоянной массы над прокаленным кальция хлоридом и хранят при температуре минус 20 °С.

На стадии производства субстанцию испытывают по следующим показателям:

Подлинность. Субстанция должна тормозить реакцию пассивной гемагглютинации (положительная РТПГА) в гомологичной «А» системе в концентрации, не превышающей 0,4 мкг полисахарида в 1 мл, при отсутствии тормозящего эффекта в гетерологичной «С» системе с содержанием полисахарида 50 мкг/мл (см. подраздел «Подлинность» раздела «Испытания»).

Белок. Не более 1 %. Определение проводят по методу Лоури без предварительного осаждения белка в соответствии с ОФС «Определение белка колориметрическим методом (метод Лоури) в иммунобиологических лекарственных препаратах». Субстанцию предварительно растворяют в воде очищенной до концентрации 5 мг/мл.

Нуклеиновые кислоты. Не более 1 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение нуклеиновых кислот по методу Спирина в иммунобиологических лекарственных препаратах». Субстанцию предварительно растворяют в воде очищенной до концентрации 5,0 мг/мл.

О-ацетильные группы. Не менее 2 мкмоль/мг. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение О-ацетильных групп». Субстанцию предварительно растворяют в воде очищенной до концентрации 1 мг/мл.

Фосфор. Не менее 8 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрическое определение фосфора в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Молекулярные параметры. Не менее 65 % полисахарида, элюируемого до достижения значения коэффициента распределения Kd, равного 0,50 (подраздел «Молекулярные параметры» раздела «Испытания»).

Пирогенность. Субстанция должна быть апирогенной. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Тест-дозу 0,025 мкг/мл вводят по 1 мл на 1 кг массы животного.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Аморфная масса в форме таблетки или рыхлого порошка от белого до беловато-серого цвета. Восстановленный препарат - бесцветный или желтоватого цвета раствор. Определение проводят визуально.

Подлинность. Вакцина должна вызывать торможение реакции пассивной гемагглютинации (положительная РТПГА) в гомологичной «А» системе, не превышающей 0,4 мкг полисахарида в 1 мл, при отсутствии тормозящего эффекта в гетерологичной «С» системе с содержанием полисахарида 50 мкг в 1 мл.

Ингредиенты для проведения реакции торможения пассивной гемагглютинации (РТПГА):

- исследуемый раствор вакцины, содержащий 50 мкг полисахарида серогруппы А в 1 мл;

- менингококковые сыворотки серогрупп А и С, и диагностикумы менингококковые эритроцитарные серогрупп А и С;

- 0,9 % раствор натрия хлорида.

Определение рабочего разведения менингококковых диагностических сывороток. Для приготовления рабочего разведения менингококковых диагностических сывороток определяют их специфический титр в РТПГА с диагностикумами эритроцитарными менингококковыми серогрупп А и С. Для постановки РТПГА используют круглодонный планшет для иммунологических реакций однократного применения. В 2 ряда лунок, начиная со второй, вносят по 50 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида. В первые лунки вносят по 100 мкл менингококковых сывороток серогрупп А и С, разведенных 1:10 с помощью 0,9 % раствора натрия хлорида. Далее готовят двукратные последовательные разведения каждой сыворотки, перенося из лунки в лунку по 50 мкл сыворотки. Из последней лунки 50 мкл разведения сыворотки удаляют. Затем в каждую лунку прибавляют по 25 мкл эритроцитарного диагностикума, гомологичного сыворотке. В 4 лунки (контроль отсутствия спонтанной агглютинации диагностикума) вносят по 50 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида. В 2 лунки добавляют по 25 мкл диагностикума серогруппы А, а в 2 другие – по 25 мкл диагностикума серогруппы С. После перемешивания ингредиентов путем покачивания планшет помещают в термостат при температуре от 36 до 38 °С на 2 – 2,5 ч, после чего проводят учет результатов. Последнее разведение сывороток, в котором наблюдается агглютинация почти всех эритроцитов с малозаметным кольцом из осевших неагглютинированных эритроцитов, является титром сыворотки и содержит 1 гемагглютинирующую единицу (ГАЕ). Предыдущее разведение содержит 2 ГАЕ и используется в качестве рабочего разведения сыворотки.

В контрольных лунках агглютинация должна полностью отсутствовать, а эритроциты выпадать на дно лунки в виде полусфер.

Проведение РТПГА. В первые лунки 2 рядов планшета для иммунологических реакций вносят по 50 мкл испытуемого раствора вакцины менингококковой серогруппы А в исходной концентрации 50 мкг в 1 мл. В остальные лунки вносят по 25 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида. Затем исходные растворы вакцины титруют путем двукратных разведений в объеме 25 мкл до 12-й лунки включительно; из последней лунки 25 мкл удаляют. В каждую лунку первого ряда добавляют по 25 мкл рабочего разведения гомологичной сыворотки. В каждую лунку второго ряда добавляют по 25 мкл гетерологичной сыворотки. После 15 – 20 мин экспозиции при температуре от 18 до 22 °С в каждую лунку добавляют по 25 мкл эритроцитарного диагностикума, гомологичного добавленной сыворотке. Таким образом, в 1 ряду реагирующая смесь будет состоять из гомологичных вакцине сыворотки и эритроцитов, во втором ряду – из вакцины и гетерологичных ей сыворотки и эритроцитов. Реакцию учитывают после 1,5 – 2 ч инкубирования в термостате при температуре от 36 до 38 °С. После окончания инкубации отмечают минимальную концентрацию вакцины, которая подавляет агглютинацию эритроцитов. Специфичность вакцины подтверждается, если задержка гемагглютинации наблюдается только в гомологичной системе.

Контролем являются отсутствие спонтанной агглютинации и проверка правильности выбранного рабочего разведения сыворотки.

Время растворения. Содержимое ампулы должно полностью раствориться в 2,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида в течение 1 мин при встряхивании.

Прозрачность восстановленного раствора. Восстановленная вакцина должна выдерживать сравнение с эталоном I. Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей». Содержимое 4 ампул растворяют в 10 мл 0,9 % раствора натрия хлорида.

Цветность восстановленного раствора. Восстановленная вакцина должна выдерживать сравнение с эталоном Y_4. Определение проводят в

соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей». Содержимое 4 ампул растворяют в 10 мл 0,9 % раствора натрия хлорида.

Механические включения. Восстановленная вакцина должна соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

Потеря в массе при высушивании. Не более 2,5 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Точность розлива. Не более 10 %. Определение проводят весовым методом. 20 ампул без этикеток обрабатывают смесью спирта с эфиром и помещают в эксикатор на 3 ч. Затем верхнюю часть каждой ампулы надпиливают и удаляют. Вскрытые ампулы с веществом взвешивают на аналитических весах, после чего содержимое удаляют, ампулы промывают водой, ополаскивают водой очищенной. После этого ампулы выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100 – 105 °С до постоянной массы. По разности масс ампулы с содержимым и без него рассчитывают коэффициент вариации (V) в процентах по формулам:

$$V = \frac{S \cdot 100}{\bar{x}},$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum(X - \bar{x})^2}{n - 1}},$$

где S – стандартное отклонение;

$\bar{x}$ – среднее арифметическое значение массы вещества в ампуле;

X – масса вещества в каждой ампуле;

n – число ампул.

Фосфор. Содержание фосфора в вакцине должно быть не менее 7,5 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрическое определение фосфора в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Молекулярные параметры. Не менее 65 % полисахарида, элюируемого до достижения значения коэффициента распределения Kd = 0,50. Определение молекулярных параметров проводят методом эксклюзионной хроматографии в соответствии с методикой, изложенной в нормативной документации, где должны быть указаны: размер хроматографической колонки, характеристика носителя и способ его приготовления, методика приготовления элюирующего раствора, количество и способ введения испытуемого и стандартных образцов, скорость элюирования подвижной фазы, условия калибрования колонки, объем элюируемых фракций, процедура сбора фракций.

Содержание полисахарида. Вакцина должна содержать не менее 70 % и не более 130 % полисахарида, входящего в состав препарата. Содержание полисахарида рассчитывают путем пересчета содержания фосфора на полисахарид или иммунохимическим методом, описанным в нормативной документации.

Стерильность. Вакцина должна быть стерильна. Определение проводят методом прямого посева в соответствии с ОФС «Стерильность».

Аномальная токсичность. Вакцина должна быть нетоксичной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Тест-доза для 5 белых мышей – по 100 мкг полисахарида внутрибрюшинно, тест-доза для 2 морских свинок – по 500 мкг полисахарида внутрибрюшинно. Период наблюдения за животными составляет 7 сут.

Пирогенность. Вакцина должна быть апирогенной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Тест-доза 0,025 мкг/мл полисахарида вводится по 1 мл на 1 кг массы животного.

Содержание лактозы. Должно быть в пределах (10 ± 1) мг в пересчете на ампулу. Определение проводят в соответствии с ОФС «Рефрактометрия». В 3 ампулы с вакциной добавляют по 1 мл воды очищенной. Содержимое ампул объединяют. На призму рефрактометра наносят 1 каплю раствора испытуемого образца и определяют показатель преломления. По

калибровочному графику находят концентрацию лактозы. Содержание лактозы в 1 ампуле вычисляют как среднее арифметическое 3 измерений.

Построение калибровочного графика. В 10 стеклянных пробирок вносят пипеткой по 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 и 1 мл основного раствора лактозы, доводят объем водой очищенной до 1 мл и перемешивают (содержание лактозы соответственно: 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5; 20; 22,5 и 25 мг/мл). Измеряют показатель преломления каждого раствора и строят калибровочный график, откладывая по оси абсцисс количество лактозы в мг/мл, а по оси ординат – показатель преломления. Калибровочный график воспроизводят при каждом анализе.

Примечание.

Приготовление 2,5 % основного раствора лактозы. В мерной колбе вместимостью 100 мл растворяют в воде очищенной 2,5 г лактозы моногидрата при нагревании на водяной бане при температуре не выше 60 °С. Объем раствора доводят водой до метки и перемешивают. Перед использованием охлаждают до комнатной температуры. Основной раствор используют свежеприготовленным.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С в соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Федеральный электронный медицинский библиотека

Вакцина сибиреязвенная живая	**ФС.3.3.1.0016.15** **Взамен ГФ X, ст. 713** **ФС 42-3269-96**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину сибиреязвенную живую, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и накожного скарификационного нанесения, представляющую собой лиофилизированную в стабилизирующей среде взвесь живых спор вакцинного штамма *Bacillus anthracis* СТИ-1.

Вакцина предназначена для профилактики сибирской язвы и обеспечивает развитие специфического иммунитета продолжительностью до 1 года.

ПРОИЗВОДСТВО

Вакцинный штамм *B. anthracis* СТИ-1 должен иметь типичные культуральные, морфологические, биохимические и генетические свойства; должен обладать остаточной вирулентностью для морских свинок (при введении 50 млн спор) и белых мышей (10 млн спор), должен вызывать гибель 50 – 70 % животных; быть специфически безопасным для кроликов при введении им 250 млн спор; индекс иммунитета для морских свинок должен быть не ниже 10000.

Перед приготовлением очередной серии вакцинного штамма проводят его анимализацию путем пассажа через организм морской свинки с последующим отбором типичных колоний, выросших на плотной питательной среде при посеве селезенки.

Технология производства вакцины сибиреязвенной живой состоит из получения посевной культуры штамма *B. anthracis* СТИ-1; глубинного культивирования штамма *B. anthracis* СТИ-1 для получения нативной споровой культуры; приготовления концентрированной споровой взвеси с последующим розливом, замораживанием, сублимационным высушиванием, герметизацией и упаковкой препарата. В качестве вспомогательного вещества используют сахарозу, разрешенную для использования при производстве иммунобиологических лекарственных препаратов.

На стадиях приготовления посевной и нативных культур контролируют pH, концентрацию спор, спорообразование, отсутствие посторонней микрофлоры.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Пористая масса серовато-белого или желтовато-белого цвета с коричневатым оттенком.

Подлинность. Должна содержать чистую культуру вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1. Определение проводят при микроскопии мазков, окрашенных по Цилю-Нильсену. В мазках из препарата должны наблюдаться овальные споры розового цвета с красным ободком по периферии.

Время растворения. Должна полностью растворяться в течение 5 мин в 1 мл воды очищенной или в 1 мл 30 % водного раствора глицерола при встряхивании. Восстановленный препарат – непрозрачная гомогенная суспензия серовато-белого или желтовато-белого цвета без посторонних включений. Определение проводят визуально.

Время седиментационной устойчивости. Суспензия не должна расслаиваться в течение 5 мин. Определение проводят в соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

Размер частиц. Суспензия должна свободно проходить в шприц через иглу № 0840. Определение проводят в соответствии ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

Федеральный электронный медицинский библиотека

pH. От 6,8 до 8,3. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия». Для испытания используют содержимое 5 ампул (флаконов) препарата, разведенного в 30 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, pH (7,1 ± 0,1).

Средняя масса и отклонения от средней массы. Коэффициент вариации массы вакцины в ампулах (флаконах) должен быть не более 5 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

Потеря в массе при высушивании. Не более 5,0 %. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов. Вакцина не должна содержать посторонних микроорганизмов и грибов. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» с использованием тиогликолевой среды.

Содержимое ампулы (флакона) ресуспендируют в 2 – 3 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида. По 1 мл восстановленной вакцины и отдельно – использованного растворителя засевают в 2 пробирки с 20 мл тиогликолевой среды в каждой. Посевы инкубируют в течение 5 – 7 сут по одной пробирке из каждого образца при температуре (36 ± 1) °С для выявления аэробных и анаэробных микроорганизмов и по одной пробирке при температуре 20 – 22 °С для выявления грибов.

Через 5 – 7 сут из каждой пробирки производят пересев по 0,5 мл в 2 пробирки, содержащие по 10 мл тиогликолевой среды, и инкубируют при указанных выше температурах. Через 14 сут выращивания со дня первичного посева из всех пробирок делают мазки, окрашивают их по Граму, просматривают под микроскопом при увеличении К 7×40.

Клетки сибиреязвенного микроба представляют собой неокрашенные споры и грамположительные палочки, различающиеся по размерам (мелкие,

Федеральная электронная медицинская библиотека

средние и крупные) и по форме (продолговатые или раздутые), расположенные поодиночке или в виде коротких и длинных цепочек.

В случае обнаружения хотя бы в одном из 10 просмотренных полей зрения грамотрицательной микрофлоры или грамположительных кокков препарат считается загрязненным посторонней микрофлорой. Если в повторном испытании результат будет таким же, препарат считают не выдержавшим испытание.

Специфическая безопасность. Вакцина должна быть безопасной. Испытание проводят на 2 кроликах массой 2 – 2,5 кг. Животных взвешивают и измеряют температуру в течение 3 сут и за 30 мин до проведения испытания.

Вакцину вводят подкожно в область внутренней поверхности бедра в дозе 250 млн спор в объеме 1 мл. Наблюдение проводят в течение 10 сут. Вакцина не должна вызывать гибель животных и на месте введения не должен развиться некроз или инфильтрат. Допускается потеря массы тела животного до 10 % от исходной величины в течение первых 8 сут и повышение температуры тела не более чем на 1 °С на 1 – 2 сут после введения вакцины.

При несоблюдении указанных требований проводят повторный контроль на удвоенном количестве животных. Если при повторном контроле результат будет таким же, препарат считают не выдержавшим испытание.

Специфическая активность

1. Общая концентрация спор. Общая концентрация (ОК) спор в зависимости от содержания в ампуле (флаконе) человеческих доз должна составлять 8 – 12 млрд спор/мл или 4 – 6 млрд спор/мл. Концентрацию спор определяют методом подсчета в камере Горяева. Содержимое ампулы (флакона) с вакциной ресуспендируют в 1 мл воды очищенной и делают последовательные десятикратные разведения в воде очищенной до

исчезновения в последней пробирке отчетливо видимой мутности. Взвесью спор из этого разведения заполняют камеру Горяева и через 5 – 10 мин с помощью микроскопа с фазово-контрастным устройством (объектив 40×, окуляр 7×) подсчитывают количество спор в 10 больших квадратах сетки. Число спор (ОК) в 1 ампуле (1 мл) исходной вакцины определяют по формуле:

$$ОК = 25000 \cdot n \cdot p,$$

где: n – количество спор в 10 больших квадратах;

p – кратность разведения;

25000 – постоянная величина для камеры данного типа.

2. Количество живых спор. Количество живых спор должно составлять не менее 40 % от общей концентрации.

В исследованиях используют агар Хоттингера – аминный азот (230 ± 10) мг %, pH (7,2 ± 0,1) – или мясопептонный агар (МПА), pH (7,2 ± 0,1).

При определении содержания живых микробных клеток в вакцине используют концевые химически чистые пипетки и пробирки со стерильной водой очищенной.

Содержимое каждой из 3 ампул ресуспендируют в 1 мл стерильной воды очищенной, встряхивают до образования гомогенной взвеси. Содержимое каждой ампулы с помощью стерильных пипеток переносят в 3 стерильные колбы вместимостью 250 мл с 99 мл воды очищенной и фарфоровыми или стеклянными бусами и закрывают ватно-марлевыми пробками. Колбы помещают на шуттель-аппарат и выдерживают в течение 30 мин при температуре (20 ± 2) °С и скорости 50 покачиваний в минуту.

Исходя из общей концентрации спор, определенной в камере Горяева, взвесь спор десятикратно разводят водой очищенной до содержания примерно 1000 спор в 1 мл. Например, из взвеси спор, разведенной в колбе в 100 раз, делают 5 последовательных десятикратных разведений, используя

для каждого разведения отдельную пипетку вместимостью 1 мл, и получают последнее разведение 10^{-7}, в котором будет содержаться 1000 спор/мл.

Из разведения, содержащего около 1000 спор в 1 мл, высевают по 0,1 мл на 5 чашек Петри с питательной средой, равномерно распределяя материал на поверхности среды стеклянным шпателем или методом покачивания. Чашки переворачивают и инкубируют при температуре (36 ± 1) °С в течение 24 – 36 ч, после чего подсчитывают количество выросших колоний на каждой чашке Петри.

Расчет концентрации живых спор (БК), выраженное количеством спор в 1 мл вакцины, проводят по формуле:

$$\text{БК} = \frac{2 \cdot n \cdot p}{3},$$

где: 2 – коэффициент пересчета на 1 мл пробы;

n – общее количество колоний, выросших на 15 чашках при высеве 0,5 мл каждой из 3 исследуемых проб;

p – кратность разведения.

Процентное содержание живых спор вычисляют по формуле:

$$\%\ \text{живых спор} = \frac{\text{БК}}{\text{ОК}} \cdot 100\ \%.$$

3. Иммуногенность для морских свинок. Индекс иммунитета должен быть не менее 10000 (отношение величины LD_{50} заражающего тест-штамма *B. anthracis* 71/12 для иммунизированных животных к величине LD_{50} для неиммунизированных животных).

Иммунизируют испытуемой вакциной 20 морских свинок обоего пола массой (275 ± 25) г однократно подкожно в область внутренней поверхности бедра в дозе 50 млн спор в объеме 0,5 мл. Одновременно 20 контрольным морским свинкам вводят по 0,5 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида. Через 21 сут иммунизированных и неиммунизированных животных подкожно инфицируют тест-штаммом *B. anthracis* 71/12. Для заражения иммунизированных животных используют дозы 10^6; 10^7; 10^8 и 10^9 ,

разведенные из общего количества спор; для неиммунизированных животных используют дозы 10^2; 10^3; 10^4 и 10^5, также разведенные из общего количества спор тест-штамма. Каждую заражающую дозу вводят в объеме 0,5 мл 5 иммунизированным и 5 неиммунизированным морским свинкам. За животными наблюдают в течение 10 сут. Погибших животных вскрывают и делают посевы путем отпечатков верхушек сердца на чашки Петри с питательной средой. Сибиреязвенную инфекцию подтверждают в случае обнаружения роста, характерного для сибиреязвенного микроба. Затем рассчитывают величины LD_{50} заражающей тест-культуры для иммунизированных и неиммунизированных животных и определяют индекс иммунитета.

При значении индекса иммунитета менее 10000 опыт повторяют по той же методике в сравнении со стандартным образцом. Если при повторном контроле результат будет таким же, препарат считают не выдержавшим испытание.

Растворители, выпускаемые в комплекте с препаратом. 30 % раствор глицерола в воде для инъекций.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование в течение 20 сут при температуре не выше 25 °С.

Федеральный ЭМБ
медицинская библиотека

Вакцина сибиреязвенная комбинированная	**ФС.3.3.1.0017.15** **Взамен ГФ X, ст.713** **ФС 42-3297-96**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину сибиреязвенную комбинированную, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения, представляющую собой лиофилизированную в стабилизирующей среде смесь взвеси живых спор вакцинного штамма *Bacillus anthracis* СТИ-1 и концентрированного протективного сибиреязвенного антигена (ПА), адсорбированного на геле алюминия гидроксида.

Вакцина предназначена для профилактики сибирской язвы и обеспечивает развитие специфического иммунитета продолжительностью до 1 года.

ПРОИЗВОДСТВО

Вакцинный штамм *B. anthracis* СТИ-1 должен иметь типичные культуральные, морфологические, биохимические и генетические свойства; должен обладать остаточной вирулентностью для морских свинок (при введении 50 млн спор) и белых мышей (10 млн спор); должен вызывать гибель 50 – 70 % животных; должен быть специфически безопасным для кроликов при введении им 250 млн спор; индекс иммунитета для морских свинок должен быть не ниже 10000.

Перед приготовлением очередной серии вакцинного штамма проводят его анимализацию путем пассажа через организм морской свинки с

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

последующим отбором типичных колоний, выросших на плотной питательной среде при посеве селезенки.

Технология изготовления вакцины сибиреязвенной комбинированной состоит из получения посевной культуры *B. anthracis* СТИ-1; глубинного культивирования посевной культуры *B. anthracis* СТИ-1 для получения нативной споровой культуры; приготовления концентрированной споровой взвеси; приготовления концентрированного протективного антигена (ПА) методом сепарирования нативной культуры штамма *B. anthracis* СТИ-1 с последующим концентрированием и стерилизующей фильтрацией на установках ультрафильтрации или методом микрофильтрации; сорбции концентрированного ПА на геле алюминия гидроксида; стабилизации сорбированного ПА формальдегидом с последующей отмывкой 0,9 % раствором натрия хлорида; смешивания сорбированного концентрированного ПА с концентратом споровой культуры *B. anthracis* СТИ-1 с последующим розливом, замораживанием, сублимационным высушиванием, герметизацией и упаковкой препарата. В качестве стабилизатора используется сахароза, разрешенная для использования при производстве иммунобиологических лекарственных препаратов.

На стадиях приготовления посевной и нативных культур контролируют pH, концентрацию спор, отсутствие посторонней микрофлоры. Качество ПА определяют по следующим показателям: стерильность, pH, содержание общего азота, алюминия гидроксида и формальдегида.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Пористая масса серовато-белого цвета.

Восстановленный препарат – гомогенная суспензия серовато-бежевого цвета без посторонних примесей и включений.

Подлинность. Определение подлинности вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1 проводят микроскопическим методом**.** В мазках, окрашенных по Цилю-Нильсену, должны наблюдаться овальные споры

розового цвета с красным ободком по периферии.

Определение подлинности ПА проводят методом иммунодиффузии в агаре по Оухтерлони с иммуноглобулином противосибиреязвенным лошадиным. Методика изложена в разделе «Специфическая активность».

Время растворения. Вакцина должна полностью растворяться течение 5 мин в 5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида при встряхивании.

Время седиментационной устойчивости. Суспензия не должна расслаиваться в течение 5 мин. Определение проводят в соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

Размер частиц. Суспензия должна свободно проходить в шприц через иглу № 0840. Определение проводят в соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

pH. От 7,1 до 7,3. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия». Для испытания используют содержимое 5 ампул (флаконов) препарата, разведенного в 25 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, pH (7,1 ± 0,1).

Средняя масса и отклонение от средней массы. Коэффициент вариации массы вакцины в ампулах (флаконах) должен быть не более 5 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

Потеря в массе при высушивании. Не более 5,0 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Общий азот. Не более 0,4 мг/мл. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение общего азота с реактивом Несслера в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Алюминия гидроксид. Не более 2,7 мг/мл алюминия (III). Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение ионов алюминия в сорбированных иммунобиологических лекарственныхпрепаратах».

Формальдегид. Не более 0,001 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение формальдегида в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Полнота сорбции антигена. Надосадочная жидкость должна содержать не более 25 ЕА/мл (единиц активности в мл). Содержимое ампулы (флакона) ресуспендируют в 5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, перемешивают и отделяют осадок центрифугированием при 2000 об/мин в течение 30 мин. Отбирают 1 мл надосадочной жидкости и разводят в 2; 4 и 8 раз 0,2 М фосфатным буферным раствором, pH (7,2 ± 0,1). Определение полноты сорбции антигена проводят в реакции иммунодиффузии в агаре по Оухтерлони с иммуноглобулином противосибиреязвенным лошадиным. Приготовление агара, постановку реакции и расчет результатов анализа проводят, как описано в разделе «Специфическая активность».

Полноту сорбции оценивают по максимальному разведению супернатанта, при котором еще образуется видимая линия преципитации с иммуноглобулином противосибиреязвенным, и выражают в единицах активности, содержащихся в 1 мл (ЕА/мл).

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов. Вакцина не должна содержать посторонних микроорганизмов и грибов. Определение проводят, в соответствии с ФС «Вакцина сибиреязвенная живая».

Специфическая безопасность. Вакцина должна быть безопасной. Вакцину растворяют в 5 мл 0,9 % натрия хлорида для инъекций. Испытание проводят по методике, описанной в ФС «Вакцина сибиреязвенная живая». Животным вводят вакцину подкожно в область внутренней поверхности каждого бедра в объеме 1,25 мл (общий объем – 2,5 мл).

Специфическая активность

1. Количество живых спор. Процент живых спор на плотной питательной среде должен составлять не менее 30 от расчетной концентрации. В 1 мл препарата после ресуспендирования расчетная концентрация составляет (100 ± 20) млн спор *B. anthracis* СТИ-1.

В каждую из 3 ампул (флаконов) вносят 5 мл воды очищенной, встряхивают до образования гомогенной взвеси. Далее определение проводят по методике в соответствии с ФС «Вакцина сибиреязвенная живая».

2. Активность (ПА. Активность ПА должна быть не менее 50 ЕА/мл.

Определение проводят методом иммунодиффузии в агаре по Оухтерлони с иммуноглобулином противосибиреязвенным лошадиным. Для приготовления агара к 1 л 0,1 М фосфатного буферного раствора, pH (7,8 ± 0,1) добавляют 1 % агара, 1 % желатина и 0,25 % раствор фенола. Агар стерилизуют 15 мин при температуре (115 ± 2) °С и в горячем виде осветляют центрифугированием при 2000 об/мин в течение 5 мин. Готовый агар разливают в чашки Петри, помещенные на строго горизонтальную поверхность, слоем толщиной 6 мм. Стерильным штампом-пробойником вырезают 1 центральную и 6 радиальных лунок, расстояние между центрами которых составляет 10 мм (можно выполнять этот этап по трафарету). Агар из лунок удаляют.

Вакцину последовательно разводят 0,2 М фосфатным буферным раствором, pH (7,2 ± 0,1), до разведений 1:2; 1:4; 1:6; 1:8. В центральную лунку вносят 0,04 мл цельного иммуноглобулина противосибиреязвенного лошадиного, а в радиальные лунки по часовой стрелке – все разведения вакцины, начиная с цельного неразведенного препарата. Чашки помещают в эксикатор, содержащий воду очищенную, при температуре (19 ± 1) °С в течение 3 сут. Предварительный учет результатов проводят через 24 ч, окончательный – на 3 сут.

Активность ПА оценивают по максимальному разведению вакцины, при котором образуется видимая линия преципитации с иммуноглобулином противосибиреязвенным, и выражают в единицах активности (ЕА/мл).

Расчет ПА (A) в ЕА/мл проводят по формуле:

$$A = \frac{T}{V},$$

где: T – разведение вакцины, при котором наблюдается видимая линия преципитации;

V – объем пробы, внесенный в лунку, мл.

3. Иммуногенность для морских свинок. Индекс иммунитета должен быть не менее 25000 (отношение величины LD_{50} заражающего тест-штамма *B. anthracis* 71/12 для иммунизированных животных к величине LD_{50} для неиммунизированных животных). В 4 образца с вакциной вносят по 5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида для инъекций, встряхивают до образования гомогенной взвеси. Иммунизирующую дозу в объеме 0,5 мл вводят морским свинкам подкожно в область внутренней поверхности бедра. Далее определение проводят в соответствии с ФС «Вакцина сибиреязвенная живая».

4. Иммуногенность для кроликов. Препарат должен предохранять от гибели не менее 8 из 10 кроликов, привитых подкожно одной человеческой дозой вакцины, при подкожном инфицировании 100 LD_{50} вирулентного штамма сибиреязвенного микроба.

Испытание проводят на кроликах обоего пола массой (2,25 ± 0,25) кг. Животных иммунизируют однократно подкожно в область внутренней поверхности бедра в объеме 0,5 мл (одна человеческая доза вакцины). Одновременно 3 контрольным кроликам вводят по 0,5 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида.

Для определения LD_{50} тест-культуры *B. anthracis* Ч-7 интактных кроликов инфицируют дозами 10^1; 10^2; 10^3 и 10^4 спор. Каждую дозу вводят не менее чем 3 кроликам подкожно в паховую область задней конечности в объеме 1 мл. Наблюдение за животными проводят в течение 10 сут. Рассчитывают LD_{50} по методу Кербера в модификации И. П. Ашмарина.

Через 10 сут кроликов (10 иммунизированных и 3 контрольных – неиммунизированных) заражают 100 LD_{50} споровой культуры *B. anthracis* Ч-7. Наблюдение за животными проводят в течение 10 сут. Погибших животных вскрывают и делают посев 0,1 мл крови из сердца на чашки Петри

с агаром Хоттингера, pH (7,2 ± 0,1). Сибиреязвенную инфекцию подтверждают в случае обнаружения роста, характерного для сибиреязвенного микроба. Зараженные контрольные (неиммунизированные) кролики должны погибнуть в течение 3 сут.

Растворители, выпускаемые в комплекте с препаратом. 0,9 % раствор натрия хлорида.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8°С.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Вакцина туберкулезная БЦЖ живая	**ФС.3.3.1.0018.15** **Взамен ГФ X, ст.716,** **ФС 42-3558-98,** **ФС 42-3559-98**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину туберкулезную БЦЖ живую, которая состоит из микобактерий вакцинного штамма *Mycobacterium bovis*, субштамм *BCG-1* (Russia), лиофилизированных в 1,5 % растворе стабилизатора – натрия глутамата моногидрат. Развивающийся в ответ на вакцинацию туберкулезной вакциной клеточный иммунный ответ в значительной степени зависит от активности макрофагов, в которых бактерии штамма БЦЖ размножаются. Механизм защиты заключается в ограничении распространения микобактерий туберкулеза из очага инфекции, что обусловлено формированием иммунологической памяти Т-лимфоцитов, выработка которых индуцирована первичной инфекцией вследствие БЦЖ-вакцинации.

Препарат предназначен для специфической профилактики туберкулеза.

ПРОИЗВОДСТВО

Все этапы производства вакцины должны осуществляться с соблюдением установленных требований организации производства и контроля качества лекарственного препарата, гарантирующих качество и безопасность для человека, обеспечивающих специфическую безопасность препарата, исключающих контаминацию чужеродными агентами. Работа должна проводиться в помещениях, оборудованных автономной приточно-вытяжной вентиляцией. Питательные среды перед посевом микобактерий

должны быть проверены на стерильность. Вакцину на всех стадиях производства контролируют на отсутствие посторонней микрофлоры.

Технологический процесс на всех стадиях производства и хранения должен обеспечивать защиту от прямого воздействия света и ультрафиолетового излучения.

Производство вакцины должно осуществляться клинически здоровым персоналом, не связанным с работой с другими инфекционными агентами. Персонал не должен иметь риск туберкулезного инфицирования и должен проходить плановое периодическое обследование на отсутствие туберкулеза.

Количество микробных клеток БЦЖ и натрия глутамата моногидрата в дозе указывают в нормативной документации. Вакцину выпускают в комплекте с растворителем – 0,9 % раствор натрия хлорида для инъекций.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Пористая масса, порошкообразная или в виде тонкой ажурной таблетки белого или светло-желтого цвета, легко отделяющаяся от дна ампулы (флакона), гигроскопична.

Подлинность. При микроскопии мазков, окрашенных по Цилю-Нильсену, должны определяться окрашенные в красный цвет (кислотоустойчивые) тонкие, прямые или слегка изогнутые палочки длиной 1–4 мкм и шириной 0,3–0,5 мкм, часто с небольшими вздутиями на концах, не образующие спор и капсул. При посеве вакцины на плотную среду Левенштейна-Йенсена через 28–30 сут инкубации при температуре (37±1) ºС на поверхности среды должны вырастать характерные шероховатые плотные колонии от 0,5 до 8,0 мм в диаметре желтоватого цвета с тонкими неровными краями. Подлинность может быть подтверждена валидированным молекулярно-биологическим методом.

Время восстановления препарата. Не более 1 мин после добавления в ампулу (флакон) прилагаемого растворителя (0,9 % раствор натрия хлорида) с образованием грубодисперсной гомогенной суспензии.

Допускается наличие хлопьев, которые должны разбиваться при 2–4-кратном перемешивании с помощью шприца или пипетки.

Прозрачность и цветность раствора. Растворенная вакцина должна иметь вид грубодисперсной суспензии белого с сероватым или желтоватым оттенком цвета, без посторонних включений. Определение проводят визуально.

Общее содержание бактерий. Показатель оптической плотности должен быть в пределах от 0,30 до 0,40, что соответствует 1,0 мг/мл микробных клеток БЦЖ. Испытания проводят фотометрическим методом при длине волны (490 ± 3,0) нм в кювете с толщиной слоя 5 мм. В качестве контрольной пробы используют 0,9 % раствор натрия хлорида.

Вакцину разводят растворителем до содержания 1 мг/мл клеток БЦЖ. Проводят испытания не менее 10 образцов параллельно со стандартным образцом (СО) вакцины БЦЖ по методике, изложенной в нормативной документации.

Дисперсность. Показатель дисперсности должен быть не ниже 1,5. Испытания проводят фотометрическим методом (одновременно с определением общего содержания бактерий) по методике, изложенной в нормативной документации. Если по результатам анализа не более чем в 1 образце показатель дисперсности ниже 1,5, испытание проводят на 10 дополнительных образцах. При повторном испытании не допускается наличие образцов с показателем дисперсности ниже 1,5.

Потеря в массе при высушивании или Вода. Не более 5,0 %. Испытание проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании» или методом титрования с реактивом К.Фишера в соответствии с ОФС «Определение воды».

Герметичность. Ампулы/флаконы должны быть герметичны. Определение проводят только в ампулах/флаконах укупоренных под вакуумом.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Газовая среда в ампулах/флаконах с препаратом должна давать бледно-голубое или розово-голубое свечение (10 Па - 1000 Па) при возбуждении газовой среды высокочастотным электрическим полем (20 - 50 кГц при напряжении 15-20 кВ).

Отсутствие посторонних бактерий и грибов. Посторонняя микрофлора (бактерии, грибы) должна отсутствовать за исключением микобактерий БЦЖ. Определение проводят методом прямого посева в соответствии с ОФС «Стерильность».

Аномальная токсичность. Вакцина должна быть нетоксична. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

Специфическая безопасность. Вакцина не должна содержать вирулентных микобактерий. Испытание проводят на морских свинках одного пола массой от 250 до 350 г, не получающих какое-либо лечение или диету с антибиотиками, способную повлиять на результаты теста (вводимая тест-доза 5 мг вакцины в 1 мл растворителя):

1) двум морским свинкам вводят вакцину под кожу внутренней поверхности бедра (наблюдают за животными не менее 12 нед). Животные должны оставаться здоровыми. По истечении срока наблюдения животных умерщвляют. При макроскопическом и, при необходимости, микроскопическом исследовании внутренних органов не должно быть признаков туберкулезной инфекции. При обнаружении признаков туберкулеза серию бракуют, выпуск последующих серий вакцины прекращают, а все имеющиеся запасы вакцины хранят до выявления причин случившегося.

При гибели до окончания срока наблюдения одной морской свинки, если у нее нет признаков туберкулезной инфекции, испытания повторяют.

2) шести морским свинкам вводят вакцину подкожно или внутримышечно (наблюдают в течение 6 недель; к концу срока наблюдения должны оставаться живыми не менее 5 животных). В конце периода наблюдения животных умерщвляют. При макроскопическом и, при

Федеральная электронная медицинская библиотека

необходимости, микроскопическом исследовании внутренних органов не должно быть признаков туберкулезной инфекции. При обнаружении признаков туберкулеза хотя бы у одного животного, серию бракуют, выпуск последующих серий вакцины прекращают, а все имеющиеся запасы вакцины хранят до выявления причин случившегося.

Животных, павших до окончания срока наблюдения вскрывают и исследуют, как описано выше. При гибели одной морской свинки без признаков туберкулезной инфекции тест считается завершенным, а препарат – специфически безопасным. При гибели двух животных испытания повторяют.

Специфическая активность. Оценивают по показателю жизнеспособности – числу жизнеспособных клеток БЦЖ в 1 мг вакцины. Верхнюю и нижнюю границы показателя указывают в нормативной документации. Применяют метод посева вакцины на плотную питательную среду Левенштейна-Иенсена. Посев проводят параллельно с СО или с референс-препаратом.

Термостабильность. При хранении вакцины в течение 4 недель при температуре (37±1) °С число жизнеспособных микробных клеток в 1,0 мг вакцины должно составлять не менее 25 % от их исходного числа, которое определяют в образцах, хранившихся при температуре от 2 до 8 °С. Испытанию подлежит каждая 5 серия препарата.

Производственный штамм. Производство вакцины основано на системе посевного материала. Посевной материал (серия) – лиофилизат субштамма *M. bovis BCG-1*(Russia) из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов, Россия (ГКПМ № 700001). Очередная посевная серия вакцинного штамма БЦЖ-1 должна быть изготовлена из наиболее ранней серии (первичной или вторичной посевной серии). Посевную серию готовят в объеме, обеспечивающем производство вакцины в течение не менее 10 лет, и хранят при температуре не выше минус 18 °С.

Общее число пассажей для приготовления посевной и коммерческой серии не должно превышать 12.

Посевной материал (серия) должен быть идентифицирован как *M.bovis*, субштамм *BCG-1* (Russia) микробиологическими методами и подходящим молекулярно-биологическим методом.

Содержит не менее 10 млн жизнеспособных клеток БЦЖ в 1 мг; не должен содержать вирулентных микобактерий туберкулеза. Определение проводится по разделу «Специфическая безопасность». Контроль проводится на 10 морских свинках в течение 12 недель, к концу этого срока должны оставаться живыми не менее 90 % животных. Не должен содержать посторонней микрофлоры; обладать высоким защитным действием, которое должно быть подтверждено в экспериментах на морских свинках путем сравнения с предыдущей серией посевного материала; вызывать минимальное число неблагоприятных реакций у привитых детей (но не более 0,06 % лимфаденитов после вакцинации). Определяется при ежегодном мониторинге поствакцинальных осложнений.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С.

Федеральный электронный медицинский библиотека

Вакцина туляремийная живая **ФС.3.3.1.0019.15**

Взамен ГФ X, ст. 716

ФС 42-3178-95

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину туляремийную живую, лиофилизат для приготовления суспензии для внутрикожного введения и накожного скарификационного нанесения, представляющую собой живую культуру вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, лиофилизированную в стабилизирующей среде.

Вакцина предназначена для профилактики туляремии и обеспечивает развитие специфического иммунитета продолжительностью до 5 лет.

ПРОИЗВОДСТВО

Вакцинный штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ должен иметь типичные культуральные, морфологические, биохимические и антигенные свойства; остаточная вирулентность (LD_{50}) вакцинного штамма для белых мышей массой (19 ± 1) г должна находиться в пределах от 10^2 до $2 \cdot 10^6$ живых микробных клеток (м.к.); штамм не должен вызывать гибель морской свинки при введении дозы, равной $5 \cdot 10^9$ м.к; при накожной иммунизации морских свинок дозами $5 \cdot 10^6$ и $5 \cdot 10^7$ м.к. должен вызывать появление инфильтрата и гиперемии диаметром от 5 до 15 мм; при определении иммуногенности показатель ED_{50} для морских свинок должен быть не более 1000 микробных клеток.

Перед приготовлением производственной культуры вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ проводят его пассаж через организм морской свинки с последующим отбором типичных иммуногенных (белых) колоний, образующихся на плотной питательной среде при посеве селезенки и регионарных лимфатических узлов.

Технология производства вакцины предусматривает получение посевных культур I, II и III генераций штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ; процесс накопления биомассы, необходимой для приготовления микробной взвеси определенной концентрации; последующий розлив, замораживание, сублимационное высушивание; герметизацию и упаковку препарата. На стадиях приготовления посевных культур определяют pH, концентрацию микробных клеток, отсутствие посторонней микрофлоры.

В качестве стабилизаторов используются вещества, разрешенные для производства иммунобиологических лекарственных препаратов: сахароза, натрия глутамат, тиомочевина, желатин.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Пористая масса белого с желтоватым оттенком цвета.

Восстановленный препарат – гомогенная мутная суспензия белого с желтоватым оттенком цвета без посторонних примесей, осадка или хлопьев. Определение проводят визуально.

Подлинность. Должна содержать чистую культуру вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Определение проводят иммунофлуоресцентным методом с использованием иммуноглобулинов туляремийных диагностических флуоресцирующих в соответствии с инструкцией по применению. В мазках из препарата должно наблюдаться специфическое ярко-зеленое свечение по периферии микробных клеток.

Время растворения. Должна полностью растворяться в течение 3 мин при добавлении 1 мл воды для инъекций при встряхивании.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Время седиментационной устойчивости. Суспензия не должна расслаиваться в течение 5 мин. Определение проводят в соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

Размер частиц. Суспензия должна свободно проходить в шприц через иглу № 0840. Определение проводят в соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

pH. От 6,8 до 7,2. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия». Для испытания используют 20 ампул, содержимое каждой ампулы растворяют в 1 мл воды для инъекций.

Потеря в массе при высушивании. Не более 4,0 %. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании». Для испытания используют 6 образцов.

Средняя масса и отклонение от средней массы. Коэффициент вариации массы вакцины в ампулах должен быть не более 5 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов. Вакцина не должна содержать посторонних микроорганизмов и грибов. Препарат должен представлять чистую живую культуру вакцинного штамма туляремийного микроба. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» с использованием тиогликолевой среды.

За один образец принимают содержимое двух ампул препарата. В ампулы вносят по 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, перемешивают и по 1 мл каждого образца высевают в 2 пробирки, содержащие по 20 мл тиогликолевой среды. Одну пробирку из каждого образца инкубируют при температуре от 30 до 35 °С для выявления аэробных и анаэробных микроорганизмов, другую – при температуре от 20 до 25 °С для выявления грибов. Через 5 – 7 сут из каждой пробирки производят пересев по 0,5 мл в 2 пробирки, содержащие по 10 мл тиогликолевой среды, и инкубируют при указанных выше температурах. Через 14 сут выращивания со дня первичного

посева из всех пробирок делают мазки, окрашивают их по Граму и микроскопируют при увеличении 90×10.

В случае обнаружения хотя бы в одном из 10 просмотренных полей зрения грамположительных кокков или палочек препарат считается загрязненным посторонней микрофлорой.

При выявлении в мазках грамотрицательных палочек, отличающихся по морфологии от туляремийных бактерий, из этого образца готовят 3 мазка, которые обрабатывают иммуноглобулинами туляремийными диагностическими флуоресцирующими, и просматривают в каждом мазке не менее 10 полей с помощью люминесцентного микроскопа. Если не все бактерии, обнаруживаемые в препарате, специфически окрашиваются ярко-зеленым свечением по периферии микробных клеток - препарат считают не выдержавшим испытание.

Специфическая безопасность. Вакцина должна быть безопасной и не вызывать гибель более одной морской свинки из 3.

Вакцина, введенная 3 морским свинкам массой (475 ± 25) г в объеме 1 мл подкожно в дозе $5 \cdot 10^9$ м.к., полученной в соответствии со стандартным образцом (СО) мутности (10 МЕ), эквивалентным $5 \cdot 10^9$ м.к./мл туляремийных бактерий, не должна вызывать гибель животных в течение 15 сут наблюдения. В месте введения возможен некроз тканей кожи и подкожной клетчатки.

В случае, если животные остаются живыми или наступает гибель одной морской свинки, препарат считают безопасным. В случае гибели 2 и более животных испытание повторяют на их удвоенном количестве. Если при повторном контроле наблюдается гибель аналогичного количества животных, препарат считают не выдержавшим испытание.

Специфическая активность

1. Концентрация микробных клеток. В препарате должно содержаться $(2 \pm 1) \cdot 10^{10}$ м.к. в 1 мл. Колебания результатов определений в

отдельных ампулах серии не должны превышать 5 % от средней арифметической величины.

Определение проводят в трех образцах (один образец – содержимое двух ампул). В две ампулы с вакциной вносят по 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, pH (7 – 7,2), и после получения гомогенной суспензии объединяют содержимое ампул. Из каждого образца 0,5 мл суспензии используют для определения концентрации микробных клеток в 1 мл вакцины. Для этого по 0,5 мл каждого образца вакцины вносят в отдельные стандартные пробирки и добавляют 0,9 % раствор натрия хлорида до соответствия СО мутности (10 МЕ).

Концентрацию микробных клеток (ОК) определяют по формуле:

$$\text{ОК} = \frac{(0{,}5 + V) \cdot 5 \cdot 10^9}{0{,}5},$$

где: V – объём 0,9 % раствора натрия хлорида, взятого на разведение пробы, мл;

0,5 – объём испытуемого образца, мл;

$5 \cdot 10^9$ – эквивалент туляремийного микроба, соответствующий СО мутности (10 МЕ), м.к./мл.

2. *Количество живых микробных клеток.* Количество живых микробных клеток должно составлять не менее 40 % от общего количества микробных клеток. Колебания результатов определений в образцах серии не должны превышать 20 % от средней арифметической величины.

При определении содержания живых микробных клеток в вакцине используют концевые химически чистые пипетки и пробирки с 0,9 % раствором натрия хлорида, охлажденные до температуры от 2 до 8 °С.

Для определения количества живых микробных клеток из приготовленных ранее образцов взвесей вакцины делают последовательные десятикратные разведения от 10^{-1} (к 0,5 мл вакцины добавляют 4,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида) до 10^{-7}, используя для каждого разведения отдельную пипетку вместимостью 1 мл. Из последнего разведения по 0,1 мл взвеси отдельно для каждого образца высевают на 3 чашки Петри с

отконтролированными рыбно-дрожжевым питательным агаром с добавлением цистеина и глюкозы или е питательной средой для выделения и культивирования туляремийного микроба (FT-агар).

Учет результатов определения количества живых клеток в вакцине проводят через 5 сут выдерживания посевов при температуре (37 ± 1) °С.

За количество живых микробных клеток принимают среднюю арифметическую определений количества выросших колоний в 3 образцах. Полученную величину умножают на степень разведения культуры (10^{-7}) и увеличивают в 10 раз (для контроля используют 0,1 мл вакцины), получая количество живых туляремийных микробов, содержащихся в 1 мл вакцины.

Содержание живых микробных клеток в процентах (% живых м.к.) рассчитывают по формуле:

$$\%\ \text{живых м. к.} = \frac{\text{БК}}{\text{ОК}} \cdot 100\ \%,$$

где: БК – количество живых м.к. в 1 мл;
ОК – общая концентрация, м.к.

3. Степень диссоциации. Число SR иммуногенных «белых» колоний должно составлять не менее 80 % от общего количества выросших колоний.

Количество колоний определяют на тех же чашках Петри с посевами, на которых определяют содержание живых микробных клеток. После инкубации чашек Петри в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 5 сут их помещают на 24 ч в холодильник при температуре от 2 до 8 °С. После этого подсчитывают число иммуногенных «белых» и неиммуногенных «серых» колоний и вычисляют их процентное соотношение.

4. Количество накожных доз. В ампуле должно содержаться от 15 до 50 накожных доз. Количество прививочных доз в ампуле устанавливается путем деления количества живых м.к. на $2 \cdot 10^8$ м.к., составляющих одну прививочную дозу.

5. *Прививаемость.* При накожной иммунизации морских свинок дозой $2 \cdot 10^7$ живых м.к. в объеме 0,1 мл у всех животных через 2 – 5 сут вокруг насечек должны образоваться инфильтрат и гиперемия диаметром от 5 до 15 мм.

В ампулу вносят воду для инъекций из расчета 0,1 мл на 1 накожную дозу. Полученную микробную взвесь разводят 0,9 % раствором натрия хлорида в 10 раз до концентрации $2 \cdot 10^8$ живых м.к. в 1 мл и прививают 3 морских свинок массой (400 ± 25) г накожно методом скарификации в объеме 0,1 мл. На участок депилированной кожи, предварительно обработанной спиртом и эфиром (1:1), после испарения эфира наносят пипеткой 2 капли микробной взвеси на расстоянии 20 – 30 мм друг от друга. Через каждую каплю оспопрививательным пером делают по 2 параллельные некровоточащие насечки длиной 8 – 12 мм. Нанесенную на кожу взвесь тщательно втирают в течение 1 мин плоской стороной пера.

Если препарат не выдерживает испытание, контроль повторяют по той же методике на удвоенном количестве животных.

6. *Иммуногенность.* Не менее 8 из 10 морских свинок, привитых накожно дозой $2 \cdot 10^7$ живых м.к. в объеме 0,1 мл, должны быть предохранены от гибели при подкожном заражении 1000 Dcl (Dosis certa letalis) вирулентного штамма туляремийных бактерий голарктической расы, 1 Dcl которого не должна превышать 5 м.к.

Иммунизируют 10 морских свинок массой (350 ± 50) г дозой $2 \cdot 10^7$ м.к. в объеме 0,1 мл накожно скарификационным методом, как при определении прививаемости.

Через 25 – 30 сут после иммунизации проводят заражение иммунизированных животных дозой 1000 Dcl, а 3 неиммунизированных (контрольных) животных заражают 1 Dcl вирулентного штамма *F. tularensis.* Наблюдение за зараженными животными ведут в течение 30 сут.

Все контрольные животные должны погибнуть от туляремии в срок до 15 сут. У них должны наблюдаться типичные патологоанатомические

изменения (плотный инфильтрат на месте введения, гиперемия сосудов подкожной клетчатки и паховых лимфатических узлов, увеличение и уплотнение селезенки и печени). Всех павших животных вскрывают, органы и ткани высевают методом отпечатков на чашки Петри с рыбно-дрожжевым агаром с добавлением цистеина и глюкозы или FT-агаром с добавлением 5 % крови.

В случае гибели более 2 свинок из 10 иммунизированных и всех зараженных животных испытание повторяют по той же методике в сравнении со стандартным образцом вакцины туляремийной живой.

Если при повторном контроле погибли более 2 свинок из 10 иммунизированных и зараженных, а для стандартного образца эти показатели остались в пределах нормы – данную серию считают не выдержавшей испытание.

Термостабильность. Не менее 7 сут. Показатель термостабильности (срок, в течение которого в препарате сохраняется 50 % живых микробных клеток по отношению к первоначальному количеству) определяют в 3 образцах после хранения вакцины при температуре (37 ± 1) °С в течение 14 сут.

Методика определения количества живых микробных клеток изложена в разделе «Специфическая активность».

Показатель термостабильности (t) в сут рассчитывают по формуле:

$$t = \frac{0{,}3 \cdot 14}{\lg A_0 - \lg A_n},$$

где: $\lg A_0$ – логарифм первоначального количества живых м.к./мл;
$\lg A_n$ – логарифм количества живых м.к./мл через 14 сут хранения вакцины при температуре (37 ± 1) °С;
0,3 – постоянная величина;
14 – срок хранения вакцины при температуре (37 ± 1) °С, сут.

Растворители, выпускаемые в комплекте с вакциной. Вода для инъекций в ампулах по 5 мл.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С.

Вакцина холерная бивалентная химическая, таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой	**ФС.3.3.1.0020.15** **Взамен ГФ X, ст.719** **ФС 42-426 ВС-94**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину холерную бивалентную химическую, таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой, которая представляет собой смесь холерогена-анатоксина и О-антигена, полученных из инактивированных штаммов классического биовара 569 В *V. cholerae* О1, серовара Инаба и М-41 серовара Огава.

Вакцина предназначена для профилактики холеры и вызывает развитие специфического иммунитета длительностью до 6 мес.

ПРОИЗВОДСТВО

Для производства вакцины используют штаммы *V. cholerae* О1 – гиперпродуценты холерного экзотоксина (холерогена), несущие гены, ответственные за синтез холерного токсина (ctx A, B) и О-антигена. Производственные штаммы *V. cholerae* О1 должны, иметь типичные культурально-морфологические, биохимические и антигенные свойства; обладать холерогенными, токсигенными и иммуногенными свойствами.

Технология производства вакцины холерной бивалентной химической предусматривает культивирование штаммов-продуцентов в жидких питательных средах (3 пассажа); инактивирование культур формалином; последующее выделение из полученной биомассы *V. cholerae* О1 сероваров

Федеральная электронная медицинская библиотека

Инаба и Огава специфических фракций холерогена-анатоксина и О-антигенов; их очистка, концентрирование аммонием сернокислым; сублимационное высушивание; смешивание с разрешенными для использования в иммунобиологической промышленности наполнителями (сахароза, крахмал, тальк, кальция стеарат); таблетирование и покрытие таблеток кислотоустойчивой оболочкой из целлацефата (ацетилфталилцеллюлоза). В процессе производства вакцины проводят контроль чистоты и концентрации бактериальной культуры, контроль стерильности инактивированной культуры, контроль диализа специфических фракций, контроль на отсутствие сульфат - ионов и ионов аммония.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Таблетка – серовато-желтая компактная масса, покрытая светлой блестящей кислотоустойчивой оболочкой**.**

Подлинность. Одна таблетка должна содержать (100000 ± 20000) единиц связывания холерогена-анатоксина (ЕС) и иметь обратный показатель титра в РНГА О1-антигена штаммов *V. cholerae* не менее 2000 условных единиц. Методика определения изложена в разделе «Специфическая активность».

Распадаемость. Определение проводят в соответствии с ОФС «Распадаемость таблеток и капсул».

Средняя масса таблетки. От 0,285 до 0,315 г. Определение проводят в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

pH растворенного препарата. От 6,7 до 7,4. Таблетку растворяют в 50 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Потеря в массе при высушивании. Не более 5,0 %**.** На каждый из 2 параллельных анализов используют навеску из 3 измельченных таблеток. Определение проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при

высушивании».

Формальдегид. Не более 0,2 %. 2 таблетки предварительно растирают в ступке, добавляют 10 мл воды очищенной, перемешивают до получения суспензии, центрифугируют в течение 15 мин при 6000 об/мин. Отбирают 2 мл прозрачной надосадочной жидкости и доводят водой очищенной до 5 мл. Далее определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение формальдегида в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Микробиологическая чистота. В 1 таблетке допускается не более 1000 колоний непатогенных микроорганизмов. Вакцина не должна содержать патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

На испытание одного образца используют 5 таблеток. Определение проводят в соответствии с правилами асептики. Каждую таблетку берут пинцетом, ополаскивают стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида, pH (7,2 ± 0,1), и помещают в фарфоровую ступку с пестиком, прикрытую марлевой салфеткой; вносят 20 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, тщательно растирают в течение 1 – 2 мин, переносят во флакон вместимостью 100 мл и перемешивают до образования гомогенной суспензии. По 0,2 мл суспензии высевают пипеткой на 10 чашек Петри с мясопептонным агаром (МПА), pH (7,3 ± 0,1), на 5 чашек с МПА с добавлением 3 – 5 % дефибринированной бараньей крови и по 1 мл вносят во флакон с 50 мл 10 % желчного бульона, pH (7,4 ± 0,1). Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 48 ч. После инкубации по 0,2 мл из флакона с желчным бульоном высевают на 5 чашек с агаром Эндо и инкубируют в течение 48 ч при температуре (37 ± 1) °С.

Учет результатов. Подсчитывают число колоний, выросших на 10 чашках. Петри с МПА. Если при посеве на МПА выросло более 1000 колоний непатогенных микробов на 1 таблетку, препарат контролируют повторно на удвоенном количестве образцов. Если при повторном контроле число выросших колоний превысит 1000, серию вакцины бракуют.

Пример расчета: 5 таблеток одной серии восстановлены в 20 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, то есть 1 таблетка восстановлена в 4 мл; далее делают высев в объеме 0,2 мл на одну чашку Петри и, соответственно на 10 чашек Петри с МПА – 2 мл. Если сумма выросших колоний составляет 500, то на 1 таблетку приходится 1000 колоний непатогенных микробов.

Не допускается наличие колоний, дающих зону гемолиза, на МПА с дефибринированной бараньей кровью. На среде Эндо должны отсутствовать как бесцветные, так и красные с металлическим блеском колонии.

Аномальная токсичность. Вакцина должна быть нетоксичной. Испытание проводят на беспородных белых мышах обоего пола массой (19 ± 1) г.

Соблюдая условия асептики, 2 таблетки от серии берут пинцетом, ополаскивают 0,9 % раствором натрия хлорида, помещают в фарфоровую ступку с пестиком, добавляют 160 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и тщательно растирают таблетки в течение 1 – 2 мин, содержимое переносят во флакон вместимостью 100 мл и тщательно перемешивают до образования гомогенной суспензии. Полученную суспензию в объеме 0,5 мл вводят подкожно в область спины вдоль позвоночника 10 животным. Животные должны оставаться живыми в течение 7 сут без видимых признаков заболевания. Масса каждого животного в день окончания наблюдения не должна быть меньше исходной. Если в течение периода наблюдения регистрируется гибель, уменьшение массы, заболевание, развитие некроза или абсцесса в месте введения хотя бы у 1 животного, испытание повторяют на удвоенном количестве белых мышей. Повторное испытание считается удовлетворительным, если препарат отвечает установленным требованиям.

Специфическая безопасность. Вакцина должна быть специфически безопасной.

Определение проводят на 2 кроликах массой (2,75 ± 0,25) кг со светлой кожей. За 24 ч до постановки испытания ножницами выстригают шерсть на

боковой поверхности тела размером 30×15 см, затем остатки шерсти удаляют кремом-депилятором.

Испытанию подлежит смесь из 3 таблеток. Таблетки пинцетом помещают в ступку и растирают в 75 мл 0,9 % раствора натрия хлорида до получения суспензии (разведение 1:25). Затем 1 мл суспензии вносят в пробирку, содержащую 9 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, получая разведение вакцины 1:250. Далее в ряд пробирок вносят по 1 мл этого разведения и добавляют 3; 5 и 7 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, получая разведения 1:1000; 1:1500 и 1:2000 соответственно. По 0,2 мл каждого разведения переносят в пробирки, добавляют к ним по 0,6 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, получая конечные разведения 1:4000; 1:6000; 1:8000, которые соответствуют 4000; 6000; 8000 ЕС анатоксина в 0,1 мл или соответственно 40 000; 60 000 и 80 000 ЕС/мл. Каждое разведение вводят 2 кроликам в объеме 0,1 мл внутрикожно на расстоянии 30 мм друг от друга, начиная с последнего разведения 1:8000.

Учет результатов проводят через 24 ч, измеряя размер папул линейкой. Вакцина специфически безопасна, если при внутрикожном введении в разведении не более 1:6000 (60000 ЕС/мл) не образуются или образуются папулы диаметром до 10 мм. Если размер папул хотя бы у 1 кролика больше 10 мм, испытание повторяют на том же количестве животных. Если при введении вакцины в разведении 1:8000 наблюдаются папулы диаметром 5 мм и более, серию вакцины бракуют.

Специфическая активность

*1. **Антигенная активность по анатоксинсвязыванию**.* Одна таблетка должна содержать (100000 ± 20000) единиц связывания анатоксина (ЕС). Испытание проводят на 2 кроликах массой (2,75 ± 0,25) кг со светлой кожей. Подготовка боковой поверхности кожи кролика изложена в разделе «Специфическая безопасность». В испытании используют стандартные

образцы (СО) холерного тест-токсина сухого (далее тест-токсин) и сыворотки антихолерогенной сухой (далее сыворотка).

Разведение СО сыворотки антихолерогенной сухой. Содержимое ампулы СО сыворотки антихолерогенной сухой растворяют в 1 мл воды очищенной, переносят во флакон объемом 100 мл и разводят водой очищенной до получения разведения сыворотки 80 АЕ/мл.

Разведение СО холерного тест-токсина сухого. В ампулу СО холерного тест-токсина сухого вносят 1 мл воды очищенной, переносят во флакон объемом 100 мл и разводят водой очищенной до получения 20 опытных доз в 1 мл раствора.

Определение ЕС проводят в смеси из 3 таблеток. Таблетки растирают в ступке, добавляют 75 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и растворяют до получения гомогенной суспензии (разведение 1:25). Затем 1 мл переносят в пробирку и добавляют 9 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, получая разведение 1:250. Далее делают ряд последовательных разведений 1:1000; 1:1500; 1:2000; 1:2500; 1:3000 и 1:3500 в 0,9 % растворе натрия хлорида. По 0,2 мл каждого разведения переносят в пробирки и добавляют по 0,2 мл сыворотки, содержащей 80 АЕ/мл, получая разведения вакцины от 1:2000 до 1:7000. Пробирки выдерживают в течение 30 мин при температуре (37 ± 1) °С. После инкубации в каждую пробирку добавляют по 0,4 мл 20 опытных доз/мл тест-токсина, получая разведения от 1:4000 до 1:14000. Пробирки встряхивают и выдерживают при температуре (37 ± 1) °С в течение 30 мин. По 0,1 мл содержимого каждой пробирки вводят внутрикожно на расстоянии 30 мм 2 кроликам в депилированный участок кожи, начиная с разведения 1:14000.

Одновременно на тех же кроликах определяют 1 АЕ сыворотки. В ряде пробирок готовят разведения антитоксической сыворотки в 0,9 % растворе натрия хлорида, содержащие 80; 60; 40; 30 и 20 АЕ в 1 мл. По 0,2 мл каждого разведения сыворотки переносят в пробирки и добавляют по 0,2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и по 0,4 мл из разведения тест-токсина,

содержащего 20 опытных доз/мл, получая содержание в сыворотке 2; 1,5; 1; 0,75; 0,5 АЕ. Пробирки выдерживают при температуре (37 ± 1) °С в течение 30 мин. После инкубации по 0,1 мл каждого разведения вводят внутрикожно 2 кроликам, начиная с 2 АЕ (контрольный ряд).

Учет результатов. Учет результатов проводят через 24 ч. Положительной реакцией в опытных рядах при введении разведений 1:8000; 1:10000; 1:12000 считают зону отека диаметром от 5 до 10 мм. Размер папулы в опытном ряду должен быть равен размеру папулы в контрольном ряду, где 1 опытная доза тест-токсина связала 1 АЕ сыворотки.

Принимая во внимание значительные колебания индивидуальной чувствительности кожи кроликов, расчет антигенной активности по ЕС проводят по одному из 4 вариантов:

1 вариант – положительная реакция в контрольном ряду наблюдается с сывороткой 1; 0,75 и 0,5 АЕ и отсутствует в разведениях 2 и 1,5АЕ; следовательно, 1 опытная доза тест-токсина связала 1 АЕ сыворотки. Наибольшее разведение вакцины, при введении которой наблюдается положительная кожная реакция у 2 кроликов в опытном ряду, например, 1:8000, следовательно, в 0,1 мл вакцины содержится 8000 ЕС или 80000 ЕС в 1 мл (в 1 таблетке).

2 вариант – положительная реакция в контрольном ряду наблюдается в разведениях сыворотки 0,75 и 0,5 АЕ; следовательно, 1 опытная доза тест-токсина связала 1,25 АЕ (2 АЕ – 0,75 АЕ) сыворотки. Наибольшее разведение вакцины, при введении которого наблюдается положительная кожная реакция у 2 кроликов в опытном ряду, например, 1:8000. Так как токсин связал 1,25 АЕ, расчет количества ЕС в препарате проводят путем умножения 1,25 · 8000, следовательно, в 0,1 мл содержится 10000 ЕС или 100000 ЕС в 1 мл (в 1 таблетке).

3 вариант – положительная реакция в контрольном ряду наблюдается в разведениях сыворотки 1,5; 1; 0,75 и 0,5 АЕ и отсутствует только с

разведением 2 АЕ; следовательно, 1 опытная доза тест-токсина связала 0,5 АЕ (2 АЕ – 1,5 АЕ) сыворотки. Например, наибольшее разведение вакцины, при введении которой наблюдается положительная кожная реакция у 2 кроликов в опытном ряду, 1:8000. Так как токсин связал 0,5 АЕ, расчет количества ЕС в препарате проводят следующим образом: 0,5 · 8000, следовательно, в 0,1 мл содержится 4000 ЕС или 40000 ЕС в 1 мл (в 1 таблетке).

4 вариант – если положительная реакция в контрольном ряду наблюдается хотя бы у 1 кролика при разведении 0,5 АЕ или во всех разведениях сыворотки – 2; 1,5; 1; 0,75 и 0,5 АЕ, то учет результата не проводят и постановку испытания повторяют на 2 кроликах. Повторное испытание считается удовлетворительным, если препарат отвечает установленным требованиям по вариантам 1, 2 или 3.

2. ***Содержание О-антигена***. Одна таблетка должна содержать не менее 2000 условных единиц О-антигена вакцинных штаммов *V. cholerae* O1 (обратный показатель титра в РНГА).

Для испытания используют 3 таблетки. Каждую таблетку тщательно растирают в отдельной ступке, добавляют 10 мл воды очищенной. Содержимое каждой ступки переносят в отдельные флаконы вместимостью 100 мл и оставляют для осаждения на 10 – 15 мин при температуре (20 ± 2) °С. По 5 мл надосадочной жидкости из каждого флакона переносят в пробирки и добавляют по 2 капли 40 % раствора натрия гидроксида; выдерживают на водяной бане при температуре (100 ± 1) °С в течение 2 мин, охлаждают водопроводной водой до температуры (19 ± 1) °С и добавляют пастеровской пипеткой по капле 0,5 % раствор розоловой кислоты до окрашивания растворов в ярко-розовый цвет. Далее в пробирки добавляют по каплям (2 – 4 капли) ледяную уксусную кислоту до перехода окрашивания растворов в желтый цвет. Затем по каплям (от 2 до 7 капель) вносят 10 % раствор натрия углекислого до появления бледно-розового окрашивания. Для

постановки реакции непрямой (пассивной) гемагглютинации (РНГА) каждую пробу вакцины дополнительно разводят 1:3 и 1:7. Для постановки РНГА используют неразведенную (цельную) пробу и полученные разведения.

Постановка РНГА (микрометод). Постановку РНГА проводят на 3 полистироловых планшетах с круглодонными лунками. В 8 лунок 6 рядов каждого планшета вносят по 0,025 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. В первые лунки каждого ряда вносят по 0,025 мл следующих образцов: в 1 – 2 ряды – цельной пробы, в 3 – 4 ряды – разведение 1:3, в 5 – 6 ряды – разведение 1:7; и делают последовательные двукратные разведения до восьмой лунки (из восьмой лунки 0,025 мл удаляют в емкость с дезинфицирующим раствором), получая разведения: в 1 – 2 рядах – от 1:2 до 1:256, в 3 – 4 рядах – от 1:6 до 1:768, в 5 – 6 рядах – от 1:14 до 1:1792. После этого в лунки всех рядов добавляют по 0,025 мл 50 % взвеси формалинизированных эритроцитов барана, разведенных в 50 раз. Содержимое лунок перемешивают покачиванием планшетов, оставляют на 15 мин при температуре (20 ± 2) °С и затем во все лунки вносят по 0,05 мл сыворотки холерной О1 агглютинирующей адсорбированной в разведении 1:2. Планшеты оставляют при температуре (20 ± 2) °С в течение 24 ч.

Постановка контроля формалинизированных эритроцитов барана. В контрольную лунку вносят 0,025 мл взвеси разведенных в 50 раз эритроцитов барана и добавляют 0,075 мл 0,9 % раствора натрия хлорида.

Учет результатов РНГА. Результат считают положительным при наличии гемагглютинации (эритроциты выпадают на дно лунки равномерным слоем в виде «зонтика», занимая не менее 2/3 сферической поверхности лунки; в ряде случаев может наблюдаться фестончатое оплывание краев агглютината).

Результат считают отрицательным при отсутствии гемагглютинации (эритроциты выпадают на дно лунки в виде темно–коричневой полусферы

или узкого колечка с ровным краем – «пуговки»). В контрольных лунках результат должен быть отрицательным.

Последние лунки ряда, в которых наблюдается положительная гемагглютинация, учитывают как показатели титров в РНГА, определяющие разведения вакцины. Рассчитывают среднее арифметическое значение обратных показателей титров в РНГА 3 разведений (в 2 повторностях) и умножают на 10 (разведение таблетки). Обратная величина титра РНГА соответствует содержанию О1-антигена вакцинных штаммов *V. cholerae* в условных единицах в 1 таблетке. Колебания результатов обратных показателей титров в РНГА в таблетках не должны превышать 5 % от средней арифметической величины.

Иммуногенность. ED_{50} должна быть не более 1/20000 части таблетки. Для испытания используют 2 таблетки, которые растирают в стерильной ступке и добавляют 10 мл 0,9 % раствора натрия хлорида (в 0,5 мл – 1/10 часть таблетки). Затем делают десятикратные последовательные разведения в 0,9 % растворе натрия хлорида, получая в 0,5 мл от 1/100 до 1/1000 части таблетки. После чего делают последовательные пятикратные разведения в 0,9 % растворе натрия хлорида, содержащие в 0,5 мл от 1/5000 до 1/125000 части таблетки. Таким образом, получают 4 иммунизирующие дозы, содержащие 1/1000, 1/5000, 1/25000 и 1/125000 часть таблетки в объеме 0,5 мл каждая. Каждую дозу вводят в объеме 0,5 мл однократно внутрибрюшинно 16 беспородным белым мышам обоего пола массой (11 ± 1) г.

Через (13 ± 1) сут по 8 иммунизированных животных заражают дозой 300 LD_{50} (допускается доза от 50 до 500 LD_{50}) внутрибрюшинно взвесью 3 – 4-часовых агаровых культур *V. cholerae* О1 биовара Эльтор, серовара Инаба и *V. cholerae* О1 биовара Эльтор, серовара Огава в объеме 0,5 мл.

Подготовка штаммов для заражения описана в нормативной документации производителя. Для контроля берут по 10 белых мышей на

каждый штамм для заражения, вводят им ту же дозу LD_{50}, что и иммунизированным животным.

Учет результатов. Наблюдение за животными ведут в течение 3 сут. В группах иммунизированных и заражённых животных для определения ED_{50} подсчитывают количество выживших. В группе зараженных белых мышей для определения 1 LD_{50} подсчитывают количество павших животных. В контрольной группе животных, зараженных 300 LD_{50}, допустимо выживание от 1 до 3 белых мышей для каждого штамма.

По методу Кербера в модификации И. П. Ашмарина подсчитывают ED_{50} и LD_{50} для каждого заражающего штамма. Если величина ED_{50} хотя бы одного из заражающих штаммов будет выше допустимого значения, контроль повторяют на том же количестве животных. Если при повторном испытании величина ED_{50} вновь превысит допустимый предел, серию бракуют.

Если при расчете величины заражающей дозы будет установлено, что она содержит менее 50 или более 500 LD_{50}, контроль повторяют на том же количестве животных. Если в контрольной группе животных, зараженных 300 LD_{50}, выживет более 3 белых мышей, контроль повторяют на том же количестве животных.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С.

Федеральный ЭМБ
медицинская библиотека

Вакцина чумная живая,	**ФС.3.3.1.0021.15**
таблетки для рассасывания	**Взамен ФС 42-3346-96**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину чумную живую, таблетки для рассасывания, представляющую собой лиофилизированную живую культуру вакцинного штамма чумного микроба *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ. Вакцина предназначена для профилактики чумы и вызывает развитие специфического иммунитета длительностью до 1 года.

ПРОИЗВОДСТВО

Все этапы производства вакцины должны гарантировать соблюдение установленных надлежащих правил, а также качество лекарственного препарата, гарантирующее его безопасность для человека.

Вакцинный штамм *Y. pestis* EV линии НИИЭГ должен обладать типичными морфологическими, культуральными и биохимическими свойствами; содержать плазмиды pFra, пестициногенности (pPst) и кальций зависимости (pCad) с молекулярными массами 60 , ≈ 6 и ≈ 47 MDa соответственно; не должен вызывать гибели морских свинок и потери их массы при введении им дозы $15 \cdot 10^9$ микробных клеток (м.к.). Иммуногенность штамма по величине ED_{50} при подкожном введении не должна превышать для морских свинок $1 \cdot 10^3$ м.к., для белых мышей – $1 \cdot 10^4$ м.к.

Перед приготовлением очередной серии вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ проводят его пассаж через организм морской свинки с по-

следующим отбором типичных колоний, выросших на чашках Петри из посевов селезенки или регионарных лимфатических узлов.

Технология изготовления вакцины предусматривает получение посевных культур *Y. pestis* EV линии НИИЭГ I, II и III генераций; процесса накопления биомассы, необходимой для приготовления микробной взвеси определенной концентрации; последующий розлив, замораживание, сублимационное высушивание; приготовление гранулята и таблеток; фасовку и упаковку препарата.

В зависимости от технологии приготовления вакцины в процессе производства используются вспомогательные вещества, разрешенные для использования в иммунобиологической промышленности: лактоза, декстрин, тиомочевина, аскорбиновая кислота, глюкоза, ментол, крахмал картофельный, какао-порошок, ванилин, кальция стеарат.

На стадиях приготовления посевных культур определяют pH, концентрацию микробных клеток и отсутствие посторонней микрофлоры.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Таблетка светло-коричневого цвета правильной круглой формы с цельными краями, ровной и плоской поверхностью. Имеет запах какао, ванилина и ментола. Определение проводят визуально.

Подлинность. Должна содержать чистую культуру вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ. Определение проводят иммунофлуоресцентным методом. Таблетку вакцины растирают в ступке, добавляют 49 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и тщательно перемешивают. Из полученной суспензии готовят три мазка, которые окрашивают иммуноглобулинами чумными диагностическими флуоресцирующими и просматривают под фазовоконтрастным и люминесцентным микроскопами не менее 50 полей зрения в каждом. В мазках из препарата микробные клетки должны светиться по периферии ярко-зеленым цветом. Допускается наличие не более 1 неокрашенной

микробной клетки в 50 полях зрения.

Распадаемость. Таблетка должна распадаться в течение 15 мин. Определение проводят в соответствии с ОФС «Распадаемость таблеток и капсул».

Средняя масса. От 0,6 до 1,0 г. Определение проводят в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

pH растворенного препарата. От 6,8 до 7,4. Таблетку растворяют в 50 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Потеря в массе при высушивании. Не более 10,0 %. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании». На каждый из двух параллельных анализов используют навеску из 3 измельченных таблеток.

Микробиологическая чистота. Таблетка может содержать не более $1 \cdot 10^3$ микробных клеток (м.к.) бактерий непатогенных микроорганизмов.

Таблетку берут стерильным пинцетом, помещают во флакон вместимостью 100 мл, содержащий 49 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида. Флакон закрывают стерильной пробкой, устанавливают на платформу шуттель-аппарата и тщательно перемешивают до полного растворения таблетки и по 0,5 мл засевают на 5 чашек Петри с агаром Хоттингера, pH (7,1 ± 0,1). Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) ºС в течение 5 сут, после чего подсчитывают число выросших колоний.

Количество живых микробных клеток (N) непатогенных микроорганизмов в таблетке рассчитывают по формуле:

$$N = \frac{\sum_n \cdot 49}{0{,}5 \cdot m},$$

где: $\sum_n$ – суммарное количество колоний, выросших на чашках Петри;

49 – объем 0,9 % раствора натрия хлорида, использованного для растворения таблетки, мл;

m – количество чашек Петри, использованных для посева; шт;

0,5 – объем суспензии, высеваемой на 1 чашку, мл.

При обнаружении хотя бы в одной таблетке более $1 \cdot 10^3$ живых м.к. испытание повторяют на удвоенном количестве таблеток. Если при повторном испытании число посторонних микроорганизмов в таблетке превышает 1×10^3 м.к., препарат считают не выдержавшим испытание.

Специфическая безопасность. Вакцина должна быть специфически безопасной. Испытание проводят на морской свинке массой (275 ± 25) г.

Таблетку вакцины растирают в ступке, добавляют 49 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и тщательно перемешивают., Полученную суспензию разводят до концентрации $15 \cdot 10^9$ м.к./мл и вводят подкожно 1 мл одной морской свинке в область внутренней поверхности бедра.

На 6-е сутки морскую свинку взвешивают, подвергают эвтаназии, отмечают патологоанатомические изменения, обнаруживаемые при вскрытии. Печень, селезенку, легкие, регионарные лимфатические узлы, кровь и ткани из места введения высевают методом отпечатков на чашку Петри с агаром Хоттингера, pH (7,2±0,1), с добавлением натрия сернистокислого в количестве 0,25 г на 1 л среды, и чашку Петри с агаром Хоттингера, pH (7,2±0,1), с добавлением генцианвиолета в количестве 0,05 г на 1 л среды. Посевы инкубируют при температуре (27 ± 1) °С в течение 3 сут.

Вакцина не должна вызывать у морской свинки потери массы к 6 сут после введения больше, чем на 20 %, не должна вызывать видимых патологоанатомических изменений в легких – кровоизлияний, очагов воспаления, гранулем, абсцессов; в посевах крови и легких не должно быть роста чумного микроба. В месте введения допускается развитие кровоизлияния и инфильтрата подкожной клетчатки, переходящих в некроз. Во внутренних органах

(селезенка и печень) допустимо развитие ограниченной узелковой реакции.

Специфическая активность

1. Содержание живых микробных клеток. Таблетка должна содержать от $30 \cdot 10^9$ до $50 \cdot 10^9$ живых микробных клеток вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ.

При определении количества живых микробных клеток в вакцине используют концевые химически чистые пипетки, пробирки с 0,9 % раствором натрия хлорида должны быть охлаждены до температуры 2 до 8 °С.

Таблетку растирают в ступке, добавляют 49 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и тщательно перемешивают. Полученную суспензию вакцины разводят в 0,9 % растворе натрия хлорида последовательно десятикратно от 10^{-1} до 10^{-7}, используя для каждого разведения отдельную пипетку. Из разведения 10^{-7} высевают по 0,1 мл на 5 чашек Петри с агаром Хоттингера с добавлением стимулятора роста (кровь гемолизированная до 1 % концентрации или натрий сернистокислый (0,25 г на 1 л среды).

Посевы инкубируют в течение 3 сут при температуре (27 ± 1) ºС, затем подсчитывают общее количество колоний на 5 чашках Петри. Количество живых микробных клеток (N) в таблетке рассчитывают по формуле:

$$N = \frac{\sum_n \cdot 10^8 \cdot 49}{m},$$

где: $\sum_n$ – суммарное количество колоний, выросших на чашках;

10^8 – степень разведения;

49 – объем 0,9 % раствора натрия хлорида, использованного для растворения таблетки, мл;

m – количество чашек Петри, используемых для посева.

2. Иммуногенность. ED_{50} для морских свинок не должна превышать $1 \cdot 10^4$, для белых мышей – $4 \cdot 10^4$ живых микробных клеток.

Испытания проводят на морских свинках массой (275 ± 25) г и на белых нелинейных мышах массой (19 ± 1) г 3 таблетки вакцины чумной живой растирают в ступке и растворяют в 0,9 % растворе натрия хлорида. Объем растворителя определяют, исходя из заранее определенного количества живых клеток в таблетке, с таким расчетом, чтобы 1 мл вакцины содержал $1 \cdot 10^9$ живых м.к. Далее определение проводят в соответствии с методикой, изложенной в ФС «Вакцина чумная живая».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Хранение и транспортирование. При температуре от 2 до 8 °С.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Вакцина чумная живая	**ФС.3.3.1.0022.15** **Взамен ГФ X, ст. 713** **ФС 42-3877-99**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину чумную живую, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций, представляющую собой живую культуру вакцинного штамма чумного микроба *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ, высушенную методом лиофилизации в стабилизирующей среде.

Вакцина предназначена для профилактики чумы и вызывает развитие специфического иммунитета продолжительностью до 1 года.

ПРОИЗВОДСТВО

Вакцинный штамм *Y. pestis* EV линии НИИЭГ должен обладать типичными морфологическими, культуральными и биохимическими свойствами; содержать плазмиды pFra, пестициногенности (pPst) и кальций-зависимости (pCad) с молекулярными массами ≈ 60, ≈ 6 и ≈ 47 MDa соответственно; не должен вызывать гибель морских свинок и потерю их массы при введении в дозе $15 \cdot 10^9$ микробных клеток (м.к.). Иммуногенность штамма по величине ED_{50} при подкожном введении не должна превышать для морских свинок 10^3 м.к., для белых мышей – 10^4 м.к.

Перед приготовлением очередной серии вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ проводят его пассаж через организм морской свинки с последующим отбором типичных колоний, выросших на чашках Петри с

агаром Хоттингера из посевов селезенки и регионарных лимфатических узлов.

Технология изготовления вакцины предусматривает получение посевных культур *Y. pestis* EV линии НИИЭГ I, II и III генераций; процесс накопления биомассы, выращенной для приготовления вакцинной взвеси с необходимой концентрацией; последующий розлив, замораживание, сублимационное высушивание, герметизацию и упаковку препарата. На стадиях приготовления посевных культур определяют pH, концентрацию микробных клеток и отсутствие посторонней микрофлоры.

В зависимости от технологии приготовления вакцины в процессе производства используются вспомогательные вещества, разрешенные для использования при производстве иммунобиологических лекарственных препаратов: сахароза, желатин, тиомочевина, декстрин, аскорбиновая кислота.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Пористая масса серовато-белого цвета.

Подлинность. Вакцина должна содержать чистую культуру вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ. Определение проводят иммунофлуоресцентным методом с помощью иммуноглобулинов чумных диагностических флуоресцирующих, в соответствии с инструкцией по применению. В мазках из препарата микробные клетки должны светиться по периферии ярко-зеленым цветом.

Время растворения. Должна полностью растворяться в течение 3 мин при добавлении 1,8 мл 0,9 % раствора натрия хлорида.

Восстановленный препарат – гомогенная суспензия серовато-белого цвета без посторонних примесей и хлопьев. Определение проводят визуально.

Время седиментационной устойчивости. Суспензия не должна расслаиваться в течение 5 мин. Определение проводят в соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Размер частиц. Суспензия должна свободно проходить в шприц через иглу № 0840. Определение проводят в соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

pH. От 6,8 до 7,8. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия». Для испытания используют 5 образцов.

Потеря в массе при высушивании. Не более 4,0 %. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании». Для испытания используют 5 образцов.

Средняя масса и отклонение от средней массы. Коэффициент вариации массы вакцины в ампулах (флаконах) должен быть не более 5 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов. Вакцина не должна содержать посторонних микроорганизмов и грибов. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методом прямого посева на тиогликолевую среду.

В ампулу (флакон) с вакциной вносят 2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. По 1 мл каждого образца полученной взвеси засевают в пробирки, содержащие по 20 мл тиогликолевой среды. Одну пробирку из каждого образца инкубируют при температуре от 30 до 35 °С для выявления аэробных и анаэробных микроорганизмов, другую – при температуре от 20 до 25 °С для выявления грибов. Через 5 – 7 сут из каждой пробирки производят пересев по 0,5 мл в 2 пробирки, содержащие по 10 мл тиогликолевой среды, и инкубируют при указанных выше температурах. Через 14 сут выращивания со дня первичного посева из всех пробирок делают мазки, окрашивают их по Граму, просматривают под микроскопом при увеличении К7×40.

В случае обнаружения хотя бы в одном из 10 просмотренных полей зрения кокков или грамположительных палочек препарат считается контаминированным посторонней микрофлорой.

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

При выявлении в мазках грамотрицательных палочек, отличающихся по морфологии от чумного микроба, готовят мазки, которые окрашивают иммуноглобулинами чумными диагностическими флуоресцирующими в соответствии с инструкцией по применению и просматривают в каждом мазке не менее 10 полей с помощью люминесцентного микроскопа. Если не все бактерии, обнаруживаемые в вакцине, дают специфическое ярко-зеленое свечение по периферии клеток, препарат считают не выдержавшим испытание.

Специфическая безопасность. Вакцина должна быть безопасной. Испытание проводят на морской свинке массой (275 ± 25) г.

Содержимое ампулы (флакона) растворяют в 1,8 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, определяют концентрацию по методике, описанной в разделе «Специфическая активность (концентрация микробных клеток)», разводят 0,9 % раствором натрия хлорида до концентрации $15 \cdot 10^9$ м.к./мл и вводят подкожно в объеме 1 мл одной морской свинке во внутреннюю поверхность бедра.

На 6 сут морскую свинку взвешивают, подвергают эвтаназии, отмечают патологоанатомические изменения, обнаруживаемые при вскрытии. Печень, селезенку, легкие, регионарные лимфатические узлы, кровь и ткани из места введения высевают методом отпечатков на чашку Петри с агаром Хоттингера, pH (7,2 ± 0,1), с добавлением натрия сернистокислого 0,25 г на 1 л среды и на чашку Петри с агаром Хоттингера, pH (7,2 ± 0,1), с добавлением генцианвиолета 0,05 г на 1 л среды. Посевы инкубируют при температуре (27 ± 1) °С в течение 3 сут.

Вакцина не должна вызывать у морской свинки потерю массы к 6 сут после введения больше чем на 20 %, не должна вызывать видимых патологоанатомических изменений в легких – кровоизлияний, очагов воспаления, гранулем, абсцессов; в посевах крови и легких не должно быть роста чумного микроба. В месте введения допускается развитие кровоизлияния и инфильтрата подкожной клетчатки, переходящих в некроз.

Во внутренних органах (селезенка и печень) допустимо развитие ограниченной узелковой реакции.

Специфическая активность

1. ***Концентрация микробных клеток.*** В препарате должно содержаться от $5 \cdot 10^{10}$ до 10^{11} м.к. в 1 мл. Определение проводят в 3 образцах для каждой серии. Колебания результатов определений в отдельных образцах не должны превышать 5 % от средней арифметической величины.

Содержимое ампулы (флакона) растворяют в 1,8 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. В стандартную пробирку вносят 0,1 мл разведенного препарата и добавляют 0,9 % раствор натрия хлорида до достижения концентрации стандартного образца (СО) мутности (10 МЕ). Объем 0,9 % раствора натрия хлорида, использованный при разведении, учитывают при расчете концентрации микробных клеток (ОК) по формуле:

$$ОК = (0{,}1 + n) \cdot 10,$$

где: 0,1 – объем растворенной вакцины, мл;

n – объем 0,9 % раствора натрия хлорида, использованный при разведении пробы, мл;

10 – постоянная величина.

2. ***Количество живых микробных клеток.*** Количество живых микробных клеток должно составлять не менее 25 % от общего количества микробных клеток. Колебания результатов определения в отдельных образцах не должны превышать 20 % от средней арифметической величины.

При определении количества живых микробных клеток в вакцине используют концевые химически чистые пипетки и пробирки с 0,9 % раствором натрия хлорида, которые должны быть охлаждены до температуры от 2 до 8 °С.

Для определения количества живых микробных клеток из приготовленных ранее образцов взвесей вакцины делают последовательные десятикратные разведения от 10^{-1} до 10^{-8}, используя для каждого разведения отдельную пипетку вместимостью 1 мл. Из пробирок с разведениями 10^{-7} и

10^{-8} высевают пипеткой по 0,1 мл взвеси на 2 чашки Петри с питательной средой для выделения и культивирования чумного микроба или с агаром Хоттингера со стимулятором роста (кровь гемолизированная до 1 % концентрации) или натрий сернистокислый (0,25 г на 1 л среды).

Через 72 – 96 ч инкубации при температуре (27 ± 1) °С подсчитывают количество колоний для каждого образца, принимая за 100 % количество микробных клеток, высеянных, исходя из показателя общей концентрации микробных клеток для данного образца, определенной с помощью СО мутности (10 МЕ). За количество жизнеспособных микробных клеток для каждой серии принимают среднее арифметическое определений для 3 ампул (флаконов).

Исходя из количества жизнеспособных микробных клеток в ампуле (флаконе) с вакциной рассчитывают количество доз и объем растворителя каждой серии для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций.

Для достоверности полученных результатов параллельно используют стандартный образец вакцины чумной живой.

3. ***Иммуногенность.*** ED_{50} вакцины для морских свинок не должна превышать 10^4, для белых мышей – $4 \cdot 10^4$ живых микробных клеток. Испытание проводят на морских свинках массой (275 ± 25) г и на белых нелинейных мышах массой (19 ± 1) г. Вакцину разводят с таким расчетом, чтобы в 1 мл содержалось 10^9 живых м.к. Исходя из заранее определенного количества живых м.к., вакцину разводят для иммунизации морских свинок до концентраций $2 \cdot 10^5$; $4 \cdot 10^4$; $8 \cdot 10^3$ и $16 \cdot 10^2$ м.к./мл; белых мышей – до концентраций $5 \cdot 10^5$; $1 \cdot 10^5$; $2 \cdot 10^4$ и $4 \cdot 10^3$ м.к./мл. Каждую дозу препарата вводят однократно 6 животным. Морских свинок иммунизируют подкожно во внутреннюю поверхность левого бедра в объеме 0,5 мл; белых мышей – в объеме 0,2 мл дозами $8 \cdot 10^2$, $4 \cdot 10^3$, $2 \cdot 10^4$ и $1 \cdot 10^5$ живых м.к.

Для определения фактического содержания живых микробных клеток в иммунизирующих дозах взвесь, содержащую $8 \cdot 10^3$ м.к./мл, используемую

при иммунизации морских свинок, или дозу $4 \cdot 10^3$ м.к./мл для иммунизации белых мышей, разводят до концентрации 10^3 м.к./мл. По 0,1 мл взвеси с концентрацией 10^3 м.к./мл (100 м.к.) высевают на 3 чашки Петри с одной из вышеперечисленных питательных сред и инкубируют при температуре (27 ± 1) °С в течение 48 ч. Количество выросших колоний на чашках учитывают при вычислении ED_{50} испытуемой серии.

Подкожное заражение морских свинок проводят во внутреннюю поверхность правого бедра на 21 сут, мышей – в ту же область на 7 или 21 сут после иммунизации. Заражающая доза для иммунизированных вакциной животных составляет 200 Dcl (Dosis certa letalis = LD_{100}) вирулентного штамма чумного микроба, 1 Dcl которого не должна превышать 100 микробных клеток.

Подготовка заражающего штамма *Y. pestis* 231 должна быть указана в нормативной документации.

Для заражения неиммунизированных (контрольных) животных используют взвесь с концентрацией 50 м.к./мл в объеме 0,5 мл для морских свинок и 125 м.к./мл в объеме 0,2 мл для белых мышей, что соответствует 1 Dcl.

Для определения фактического содержания микробных клеток заражающего штамма по 0,1 мл взвеси культуры *Y. pestis* 231, содержащей 10^3 м.к./мл, высевают на 3 чашки Петри с агаром Хоттингера и равномерно распределяют по всей поверхности среды методом «обкатки» чашек. Посевы инкубируют при температуре (27 ± 1) °С в течение 48 ч, после чего подсчитывают количество выросших колоний.

Наблюдение за зараженными животными ведут в течение 20 сут. Все контрольные животные должны погибнуть от чумы в течение 10 сут. Погибших животных вскрывают, берут органы и ткани (у морских свинок берут пробы из места введения, регионарных паховых лимфатических узлов, печени, селезенки, легких, верхушки сердца; у белых мышей – из селезенки), высевая их методом отпечатков на чашки Петри с агаром Хоттингера с

добавлением генцианвиолета и с агаром Хоттингера - с натрием сернистокислым. Чашки Петри инкубируют при температуре (27 ± 1) °С. Учет результатов проводят через 24 – 48 ч.

Павшими от чумы считают только тех животных, из органов которых при высеве выделяется культура *Y. pestis*.

ED_{50} вычисляют по формуле:

$$\lg ED_{50} = \lg D_N - S \cdot (\Sigma L_i - 0{,}5),$$

где $\lg D_N$ – логарифм максимальной иммунизирующей (фактической) дозы;

S – логарифм кратности разведений;

L_i – отношение количества животных, выживших при иммунизации данной дозой, к общему количеству животных, которым эта доза была введена;

$\sum L_i$ – сумма значений L_i, найденных для всех испытанных доз.

Если все контрольные животные выжили, или значение ED_{50} будет более допустимого, контроль повторяют на таком же количестве животных. Если при повторном испытании значение ED_{50} будет выше допустимого, препарат считают не выдержавшим испытание.

Термостабильность. Не менее 4 сут. Показатель термостабильности (срок, в течение которого в препарате сохраняется 50 % живых микробных клеток по отношению к первоначальному количеству) определяют в 3 образцах после хранения вакцины при температуре (37 ± 1) °С в течение 14 сут.

Методика определения количества живых микробных клеток изложена в разделе «Специфическая активность». Показатель термостабильности (t) в сут рассчитывают по формуле:

$$t = \frac{0{,}3 \cdot 14}{\lg A_0 - \lg A_n},$$

где: $\lg A_0$ – логарифм первоначального количества живых м.к./мл;

$\lg A_n$ – логарифм количества живых м.к./мл через 14 сут хранения вакцины при температуре (37 ± 1) °С;

ФГБУ «ЦЭМБ» Федеральная электронная медицинская библиотека

0,3 – постоянная величина;

14 – срок хранения вакцины при температуре (37 ± 1) °С, сут.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Туберкулин очищенный (ППД)	**ФС.3.3.1.0023.15**
(аллерген туберкулезный очищенный)	**Взамен ГФ X, ст. 705, ст. 706**
	ФС 42-3302-96,
	ФС 42-3303-96

Настоящая фармакопейная статья распространяется на туберкулин очищенный (ППД) аллерген туберкулезный очищенный): туберкулин очищенный в стандартном разведении (2 ТЕ в 0,1 мл), и туберкулин очищенный, лиофилизат (в ампуле 50000 ТЕ). Туберкулин очищенный (ППД) представляет собой очищенный туберкулопротеин ППД (PPD – *purified protein derivative*), полученный из инактивированных нагреванием фильтратов культур микобактерий туберкулеза (МБТ) человеческого и бычьего типов, очищенных ультрафильтрацией или другим адекватным методом, с последующим осаждением трихлоруксусной кислотой (ТХУ). Очищенный туберкулин выявляет наличие гиперчувствительности замедленного типа, которая является следствием сенсибилизации организма при вакцинации БЦЖ или заражении микобактериями туберкулеза. Препарат предназначен для диагностики туберкулеза, определения инфицированности населения микобактериями туберкулеза и отбора контингентов для вакцинации и ревакцинации против туберкулеза.

ПРОИЗВОДСТВО

Работа с микобактериями должна проводиться в помещениях, оборудованных автономной приточно-вытяжной вентиляцией, изолированных от помещений, где наличие микобактерий не допускается. Питательные среды перед посевом микобактерий должны быть проверены на

стерильность. Выросшие на поверхности жидкой синтетической среды в виде складчатых пленок культуры микобактерий инактивируют автоклавированием при температуре 121 °С в течение не менее 30 мин или текучим паром при температуре 100 °С в течение 1 ч, фильтруют и концентрируют ультрафильтрацией.

Осаждение туберкулопротеина проводят 50 % раствором ТХУ; осадок отмывают убывающими концентрациями ТХУ, обрабатывают спиртом и эфиром, сушат, проверяют на стерильность и подлинность. После получения положительных результатов сводят в единую серию порошка-полуфабриката (субстанцию). Последующее сведение таких серий в единую серию субстанции является одним из методов получения стандартного препарата длительного срока хранения (20 и более лет). Субстанцию используют для производства туберкулина очищенного в стандартном разведении (2 ТЕ в 0,1 мл), предназначенного для массовой туберкулинодиагностики, и туберкулина очищенного, лиофилизата, предназначенного для индивидуальной туберкулинодиагностики (в ампуле 50000 ТЕ).

Предварительно серию субстанции тестируют на стерильность, отсутствие сенсибилизирующих свойств, специфическую безопасность (отсутствие живых микобактерий туберкулеза), специфическую активность – определение дозы-навески, содержащей 50000 ТЕ. Специфическую активность туберкулинов выражают в туберкулиновых единицах (ТЕ), эквивалентных международным туберкулиновым единицам (TU) для больных туберкулезом.

Емкость со смесью порошков (субстанцией) хранят в эксикаторе в темном сухом месте. Каждые 5 лет субстанция подлежит повторному испытанию на стерильность и специфическую активность на животных (подтверждение дозы-навески).

ИСПЫТАНИЯ СУБСТАНЦИИ

Стерильность. Субстанция должна быть стерильной. Субстанцию растворяют в 0,9 % растворе натрия хлорида из расчета 1 мг в 1 мл.

Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Содержание белка. Должно быть не ниже 75 %. Определение проводят колориметрическим методом в соответствии с ОФС «Определение общего азота с реактивом Несслера в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Специфическая активность

Установление дозы-навески субстанции ППД, содержащей 50000 ТЕ. Определение проводят на 18 сенсибилизированных морских свинках путем сопоставления активности разведений навесок порошка-полуфабриката (субстанции) с активностью стандартного образца (СО) ППД (СО специфической биологической активности очищенного туберкулина). Сенсибилизируют животных внутрикожным введением в область живота (в 2 – 4 места) вакцины БЦЖ или убитых нагреванием микобактерий туберкулеза в неполном адъюванте Фрейнда (0,5 – 1 мг микобактерий на 1 животное).

Три навески исследуемой субстанции ППД, массой не менее 50 мг каждая, растворяют в фосфатном буферном растворе, pH (7,4 ± 0,05) таким образом, чтобы в 1 мл субстанции ППД содержалось на 20 % ниже и выше дозы навески СО ППД (получают 3 основных раствора). Сравнивают специфическую активность основного раствора с СО ППД, проводя испытание на 6 сенсибилизированных морских свинках. Для этого из основного раствора готовят разведения 1:40; 1:200 и 1:1000 и титруют относительно 5; 25 и 125 ТЕ СО, вводя внутрикожно по 0,1 мл каждого разведения сенсибилизированным морским свинкам в группе по методу случайной выборки (например, метод латинских квадратов). Ответные реакции учитывают через 24 ч. Статистический анализ основан на том, что зависимость lg «доза – эффект» имеет линейный характер. Вычисляют средний угол наклона линий и подсчитывают логарифм относительной активности (lg R) – расстояние между параллельными линиями зависимости доза – эффект. Относительная активность (R) должна быть равна (1,0 ± 0,2) при доверительных границах в пределах от 75 до 130 % (P = 0,95). За

доверительные границы принимают ± 2 стандартные ошибки логарифма относительной активности. Если бóльшая испытуемая навеска имеет по сравнению с СО ППД меньшую величину, следует увеличить навески и провести титрование. Если на меньшую навеску реакции будут с большей величиной, по сравнению с СО ППД, то следует провести титрование, используя уменьшенные навески порошка испытуемой субстанции.

Специфическая безвредность. Отсутствие живых микобактерий туберкулеза определяют на морских свинках, содержащихся в условиях, исключающих их контаминацию живыми микобактериями туберкулеза. Раствор субстанции, содержащей 50000 ТЕ/мл в фосфатном буфере без консерванта и стабилизатора, в объеме 10 мл центрифугируют при 3000 об/мин в течение 30 мин. Верхний слой надосадочной жидкости (около 8 мл) удаляют, осадок ресуспендируют и вводят внутрибрюшинно по 1 мл 2 морским свинкам массой 250 – 300 г, за которыми наблюдают 42 сут. Животные должны оставаться здоровыми. Через 42 сут морских свинок вскрывают и проводят макроскопическое, гистологическое и бактериологическое исследование внутренних органов (селезенки, легких, печени и лимфатических узлов). При макроскопическом и микроскопическом исследовании не должно быть обнаружено патологических признаков, характерных для туберкулезной инфекции. Для бактериологического (культурального) исследования тщательно гомогенизируют лимфатические узлы (все вместе), селезенку, ¼ часть печени и одно легкое. Гомогенизаты обрабатывают в течение 10 мин 5 % раствором серной кислоты, центрифугируют при 3000 об/мин в течение 15 мин, ресуспендируют в 0,9 % растворе натрия хлорида и засевают на яичную среду Левенштейна-Йенсена (не менее 5 пробирок для каждого органа). Посевы выдерживают в течение 45 сут при температуре 37 °С. Рост колоний микобактерий на поверхности среды должен отсутствовать.

Сенсибилизирующие свойства. Должны отсутствовать. Морским свинкам (3 особи) массой 300 – 350 г вводят внутрикожно трехкратно с

интервалом 5 сут по 125 ТЕ в 0,1 мл разведения субстанции. Спустя 15 сут этим и 3 интактным морским свинкам вводят внутрикожно по 500 ТЕ в 0,1 мл испытуемой субстанции. Разведения 125 и 500 ТЕ готовят из основного раствора субстанции, используя 0,9 % раствор натрия хлорида. Ответную реакцию учитывают через 24 ч, измеряя 2 взаимно перпендикулярных диаметра эритемы. Реакции у первых 3 морских свинок не должны отличаться от реакций у контрольных животных ($p > 05$). Животных содержат в условиях, исключающих контаминацию микобактериями.

ИСПЫТАНИЕ ТУБЕРКУЛИНА

Описание.

Туберкулин очищенный в стандартном разведении – бесцветная прозрачная жидкость без посторонних включений.

Туберкулин очищенный (лиофилизат) – пористая масса или аморфный порошок серовато-белого или кремового цвета, который для проведения испытаний разводят в 1 мл прилагаемого растворителя.

Подлинность. Вызывает при внутрикожном введении морским свинкам, сенсибилизированным вакциной БЦЖ, 12 – 16-суточной культурой БЦЖ или убитыми *Mycobacterium tuberculosis*, положительные реакции (как описано в разделе «Специфическая активность»).

Прозрачность. Должен быть прозрачными. Определение проводят визуально в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Цветность. Должен быть бесцветным. Определение проводят визуально в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

pH. Туберкулин очищенный в стандартном разведении: от 7,35 до 7,45; туберкулин очищенный (лиофилизат): от 6,95 до 7,75. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Стерильность. Должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методом прямого посева или

Федеральный электронный медицинский библиотека

мембранной фильтрации.

Аномальная токсичность. Должен быть нетоксичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Вводят внутрибрюшинно 5 белым мышам массой 17 – 20 г тест-дозу в объеме 0,5 мл; покожно 2 морским свинкам массой 250 – 300 г тест-дозу в объеме 1 мл. Период наблюдения за животными составляет 7 сут.

Специфическая активность. 1. Индекс специфической активности (I) туберкулина очищенного в стандартном разведении (отношение суммы реакций на испытуемый препарат к сумме реакций на СО ППД должен находиться в пределах от 0,95 до 1,05 при отсутствии достоверных различий между средними реакциями на стандартный и испытуемый образцы. Испытание проводят на 6 морских свинках, белокожих или альбиносах, массой (350 ± 50) г, сенсибилизированных, как описано выше, для определения дозы-навески субстанции. На каждом боку ставят по 4 пробы (отдельными шприцами) с 2 ТЕ в 0,1 мл испытуемой серии и 2 ТЕ СО ППД, чередуя предварительно закодированные по методу случайной выборки 8 шприцев с препаратами. Реакции регистрируют через 24 ч.

2. Относительная активность (R) туберкулина очищенного, лиофилизата, должна быть равна (1,0 ± 0,2) при доверительных границах в пределах от 75 до 130 % (P = 0,95). Из основного разведения испытуемой серии, содержащего 50000 ТЕ в 1 мл (в ампулу добавляют 1 мл прилагаемого растворителя), готовят 3 разведения: 5; 25 и 125 ТЕ в 0,1 мл, используя для этой цели 0,9 % раствор натрия хлорида. Определение проводят по разделу «Специфическая активность – определение дозы навески субстанции», используя разведения, содержащие 5; 25 и 125 ТЕ в 0,1 мл СО ППД.

Если результат испытания выходит за допустимые пределы, испытание повторяют. Результаты первого и повторного испытаний усредняют.

Производственные штаммы. Для приготовления применяют туберкулиногенные штаммы микобактерий туберкулеза *M. tuberculosis*

Dt/Strain, и/или Т-3480 и *M. bovis "Vallee"* из Государственной коллекции ПБА. Используют не более 2 пассажей на плотной питательной среде для выращивания микобактерий, не более 2 пассажей на жидкой картофельной среде и не более 8 пассажей на синтетической среде Линниковой-Могилевского.

Упаковка и **маркировка**. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты». На упаковке очищенного туберкулина, лиофилизата, должна быть надпись: «Только для специализированных медицинских учреждений».

Транспортирование и **хранение**. При температуре от 2 до 8 °С в условиях, исключающих замораживание.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Вакцина против краснухи культуральная живая	**ФС.3.3.1.0024.15 Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину против краснухи культуральную живую (лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения), представляющую собой препарат, содержащий аттенуированный вакцинный штамм вируса краснухи RA 27/3, выращенный на диплоидных клетках человека MRC-5.

Вакцина предназначена для плановой профилактики краснухи.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство вакцины против краснухи культуральной живой должно осуществляться с соблюдением установленных требований к правилам надлежащей организации производства и контроля качества лекарственных препаратов на всех этапах производства, в основе которого заложена система посевных вирусов.

В качестве субстрата для накопления вируса используют диплоидные клетки человека MRC-5.

Производство вакцины должно обеспечивать стабильность показателей качества готового продукта.

Качество исходного сырья и материалов, используемых в производстве, должно быть подтверждено соответствующими документами.

Состав вакцины. Одна прививочная доза препарата (0,5 мл) содержит:

– активный компонент: вирус краснухи – не менее 1000 (3,0 lg) тканевых цитопатогенных доз ($ТЦД_{50}$);

– вспомогательные вещества: стабилизатор, состав и количество которого указывают в нормативной документации.

Производственный штамм

Производственный штамм – вируссодержащая жидкость, приготовленная путем пассирования вакцинного штамма вируса краснухи в производственном клеточном субстрате. Производственный штамм должен быть идентифицирован с помощью документов, которые должны включать сведения о происхождении штамма, методе аттенуации и уровне пассажа, на котором аттенуация была подтверждена результатами клинических испытаний. С помощью соответствующих лабораторных методов и клинических испытаний на восприимчивых к краснухе людях должно быть доказано, что штамм вируса краснухи, используемый в производстве вакцины, безопасен и иммуногенен.

Производственный штамм вируса краснухи готовят из вакцинного штамма RA 27/3. Штамм депонирован в официальной Государственной коллекции вирусов.

Производственный штамм должен отвечать следующим требованиям:

– быть специфичным;
– обладать генетической стабильностью;
– иметь специфическую активность не ниже 4, 0 lg $ТЦД_{50}$/0,5мл;
– быть стерильным: не содержать бактерий, грибов, микоплазм, микобактерий туберкулеза и посторонних вирусов;
– должен обладать репродуктивной активностью: вызывать специфическую дегенерацию в чувствительных культурах клеток, сопровождающуюся накоплением вируса в питательной среде;
– не обладать аномальной токсичностью;
– не обладать остаточной нейровирулентностью при интрацеребральном введении обезьянам;
– не быть контагиозным;

– потеря в массе при высушивании должна быть не более 2,0 %.
– должен храниться в лиофилизированном виде при температуре минус (60±10) °С;

По указанным показателям должна быть проверена каждая новая серия производственного штамма.

Производственный штамм в процессе хранения должен быть проверен на генетическую стабильность (не реже 1 раза в 5 лет).

Примечание.

Испытание на присутствие микоплазм производственного штамма, посевного вируса, производственного и рабочих банков клеточной культуры, сыворотки крупного рогатого скота должно проводиться двумя методами: цитохимическим и микробиологическим. Испытание на присутствие микоплазм вирусных сборов, полуфабриката вакцины и готового продукта следует проводить микробиологическим методом.

Посевной вирус – вируссодержащая жидкость, полученная путем одного - двух пассажей производственного штамма на производственном субстрате; служит в качестве посевного материала для изготовления вакцины. Посевной вирус должен обладать теми же характеристиками, что и производственный штамм, из которого он получен. Каждая серия посевного вируса должна быть идентифицирована как вирус краснухи с помощью соответствующих методов.

Каждая серия посевного вируса должна быть проверена на остаточную нейровирулентность, что определяют в тесте на обезьянах по ОФС «Оценка специфической безопасности производственных штаммов и посевных вирусов кори, паротита и краснухи».

Требования к специфической безопасности вакцины касаются не только отсутствия остаточной нейровирулентности, но также и наличия генетической стабильности производственного штамма и посевных серий. Следует оценивать генетическую стабильность новых посевных серий вируса краснухи так же, как и новых серий производственного штамма. Сравнительный анализ секвенированных последовательностей генома вируса

в указанных производственных материалах должен подтвердить их идентичность структуре вакцинного штамма.

Методы культивирования должны обеспечивать сохранение иммуногенных свойств готового препарата, его безопасность и предотвращать контаминацию посторонними вирусами, бактериями, грибами и микоплазмами.

Пассажный уровень вируса в готовом препарате должен быть ограничен. Допускается пассирование производственного штамма и посевных вирусов в производственном субстрате с таким расчетом, чтобы готовая вакцина содержала вирус на том уровне пассажа, на котором ее безопасность и эффективность были подтверждены результатами клинических испытаний.

Особое внимание уделяют обеспечению стабильности таких параметров, как множественность заражения и условия культивирования (продолжительность и температура инкубации).

Рекомендуется хранить большой объем посевной серии в качестве материала для производства коммерческих серий вакцины. Серии посевного вируса в лиофилизированном виде следует хранить при температуре ниже минус 20 °С, а в нелиофилизированном виде – при температуре ниже минус 60 °С.

Клеточный субстрат, используемый для производства

Субстратом для размножения и накопления вируса краснухи являются диплоидные клетки человека MRC-5. Для производства вакцины предприятие должно использовать культуры диплоидных клеток человека, выращенные из аттестованного надлежащим образом банка рабочих клеток в соответствии с международными и национальными требованиями и требованиями ОФС «Требования к клеточным культурам – субстратам производства иммунобиологических лекарственных препаратов».

Посевные клетки и банк рабочих клеток должны быть

охарактеризованы с точки зрения генеалогии, ростовых свойств, генетических маркеров, жизнеспособности во время хранения. С помощью соответствующих тестов должно быть подтверждено, что клетки не содержат бактерий, грибов, микоплазм, а также гемадсорбирующих, гемагглютинирующих и других вирусов. Также должно быть доказано, что клетки диплоидны и стабильны.

Все работы с банком клеток и последующими клеточными культурами проводят в асептических условиях в зоне, в которой одновременно не проводится работа с другими клетками.

Питательная среда для клеток может содержать pH индикатор, например, феноловый красный.

При культивировании клеток не допускается использование нативной сыворотки крови человека, а также пенициллина и стрептомицина.

Материалы от животных, которые используют при производстве вакцины, получают от животных из хозяйств, благополучных в отношении бактериальных, вирусных, прионовых и других заболеваний, опасных для человека. Сыворотка крови крупного рогатого скота должна быть получена от животных из стада, в котором отсутствуют такие заболевания, как спонгиформная энцефалопатия и лейкоз крупного рогатого скота. Трипсин, используемый для приготовления клеточной культуры, не должен содержать микоплазм, цирко- и парвовирусов свиней, также должен быть испытан на отсутствие контаминации бактериями и грибами.

Вещества, вносимые в препарат

К веществам, вносимым в препарат, относят сыворотку крови крупного рогатого скота, которая используется для выращивания клеточной культуры. Сыворотка должна быть испытана на отсутствие контаминации вирусами, бактериями, грибами, микоплазмами.

Сыворотка крови животных должна быть удалена после инокуляции культур посевным вирусом. Перед сбором вируса культуру клеток отмывают,

и ростовую среду заменяют бессывороточной поддерживающей средой. Наличие остаточного количества бычьего сывороточного альбумина (БСА) не должно превышать 50 нг в одной прививочной дозе (0,5 мл). Определение проводят подходящим иммунохимическим методом. Количество БСА не должно превышать 50 нг в одной прививочной дозе. Определение проводят иммунохимическим методом на образце готовой серии.

Испытания на этапах производства

В процессе производства проводят исследование на присутствие контаминантов в культуральной жидкости, собранной с культур контрольных клеток, в образцах вируссодержащей жидкости. В готовом жидком полуфабрикате контролируют содержание БСА, специфическую активность, стерильность, присутствие микоплазм.

При производстве вакцины особое значение имеет постоянное выполнение на всех этапах производства внутрипроизводственного анализа основных показателей качества и анализа качества готового продукта при выпуске.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Лиофилизат - однородная пористая масса. Цвет лиофилизата указывают в нормативной документации. Определение проводят визуально.

Восстановленный препарат – прозрачная жидкость. Цветность восстановленного препарата указывают в нормативной документации. Определение проводят визуально.

Подлинность. Препарат должен содержать вирус краснухи. Определение проводят в реакции нейтрализации на культуре клеток RK-13. Подлинность вируса краснухи в вакцине устанавливают на основании нейтрализации цитопатогенного действия (ЦПД) вируса краснухи специфической иммунной сывороткой, используя аттестованный стандартный образец антител против вируса краснухи.

ФГБУ "НЦЭМБ" Федеральная электронная медицинская библиотека

Время растворения. Препарат должен растворяться в течение 3 мин при внесении в ампулу воды для инъекций из расчета 0,5 мл на одну дозу. Определение проводят визуально.

Механические включения. Восстановленный препарат должен соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и в глазных лекарственных формах».

pH (восстановленного препарата)**.** От 7,0 до 8,0, если нет других указаний в нормативной документации. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Потеря в массе при высушивании. Не более 2,0 %. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Бычий сывороточный альбумин. Не более 50 нг в одной прививочной дозе. Определение проводят подходящим количественным иммунохимическим методом, указанным в нормативной документации.

Стерильность. Препарат не должен содержать бактерий и грибов**.** Определение проводят методом прямого посева или мембранной фильтрации с использованием одной тиогликолевой среды при двух температурных режимах в соответствии с ОФС « Стерильность».

Присутствие микоплазм. Препарат не должен содержать микоплазм**.** Определение проводят микробиологическим методом в соответствии с ОФС «Испытание на присутствие микоплазм». Если при испытаниях сырья и материалов при входном контроле и на всех контрольных точках в технологическом процессе контаминация микоплазмами надлежащими методами не обнаружена, то испытание готовой серии вакцины на присутствие микоплазм может не проводиться.

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичным. Определение проводят биологическим методом на белых мышах и на

морских свинках обоего пола в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Животным вводят по одной прививочной дозе препарата в объеме 0,5 мл внутрибрюшинно, если нет других указаний в нормативной документации.

Специфическая активность. Прививочная доза (0,5 мл) должна содержать не менее 1000 (3,0 lg) $ТЦД_{50}$ вируса краснухи. Титр вируса определяют в каждой из 5 ампул серии готового продукта раздельно по ЦПД вируса на культуре клеток RK-13. Каждый образец вакцины должен иметь специфическую активность не ниже регламентированной, в противном случае проводят повторный контроль специфической активности дополнительных 5 образцов, результат которого считают окончательным. Минимально регламентированное содержание вируса в прививочной дозе должно сохраняться в течение всего срока годности.

Одновременно с определением титра вируса в образцах серии проводят титрование стандартного образца (СО) активности вируса краснухи. Одну ампулу стандартного образца титруют три раза для подтверждения достоверности каждого количественного определения активности.

Учет результатов проводят по ЦПД с помощью инвертированного микроскопа (увеличение: объектив 10× – окуляр 10×) в сроки, указанные в нормативной документации.

Наибольшее разведение вакцины, вызывающее ЦПД в 50 % лунок с зараженной клеточной культурой, принимают за титр вируса. Титр вируса в вакцине рассчитывают по методу Рида и Менча или Спирмена-Кербера.

При титровании вакцины в лунки планшетов вносят по 0,1 мл каждого разведения вакцины, т.е. объем, в 5 раз меньший, чем объем прививочной дозы. Для расчета активности вируса в прививочной дозе к титру вируса, рассчитанному в lg $ТЦД_{50}$/0,1мл, добавляют постоянную величину, равную lg 5, т.е. 0,7.

Критерии приемлемости результатов:

– диапазон доверительного интервала (P=0,95) среднего значения титра СО, определенного при трехкратном титровании 1 ампулы, должен быть в пределах ± 0,3 lg $ТЦД_{50}$;

— титр вируса в СО не должен отличаться более, чем на 0,5 lg $ТЦД_{50}$ от аттестационного значения.

Термостабильность. Препарат должен быть термостабильным. Испытание проводят, определяя специфическую активность при одновременном титровании 5 образцов вакцины, инкубированных при температуре (37 ± 1) °С в течение 7 сут, и 5 образцов вакцины, хранившихся при температуре от 2 до 8 °С. Препарат считают прошедшим испытание, если средняя геометрическая величина титра вируса в образцах после прогревания снижается не более, чем на 1 lg.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Дополнительная информация: субстрат культивирования вируса и предупредительные надписи: «Хранить при температуре от 2 до 8 °С в недоступном для детей месте», «Избегать контакта вакцины с дезинфицирующими средствами».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С.

Федеральная электронная медицинская библиотека

Вакцина антирабическая культуральная концентрированная очищенная инактивированная	**ФС.3.3.1.0025.15 Взамен ГФ X, ст.715, ФС 42-3447-97**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину антирабическую культуральную концентрированную очищенную инактивированную, которая представляет собой лиофилизированный препарат, содержащий производственный штамм «Внуково-32» фиксированного вируса бешенства, выращенный в первичной культуре клеток почек сирийских хомячков, концентрированный, очищенный и инактивированный УФ-излучением или УФ-излучением в сочетании с обработкой формальдегидом.

Одна прививочная доза вакцины должна содержать вируса бешенства антиген специфический инактивированный, имеющий специфическую активность не менее 2,5 Международных Единиц (МЕ).

Вакцина не содержит консервантов и антибиотиков.

Вакцину выпускают в комплекте с растворителем – водой для инъекций.

Вакцина антирабическая культуральная концентрированная очищенная инактивированная предназначена для профилактики бешенства.

ПРОИЗВОДСТВО

Производственный штамм вируса бешенства

Производство вакцины для профилактики бешенства должно быть основано на системе посевных материалов (seed lot system), включающей главный посевной материал и рабочий посевной материал производственного штамма «Внуково-32» фиксированного вируса бешенства.

Федеральная электронная медицинская библиотека

Количество пассажей полностью охарактеризованного главного посевного вирусного материала для получения рабочего посевного вирусного материала, используемого для производства вакцины, не должно превышать 5.

Рабочий посевной вирусный материал должен отвечать следующим требованиям.

Подлинность. Производственный штамм вируса бешенства должен нейтрализоваться иммуноглобулином антирабическим из сыворотки крови лошади и не должен нейтрализоваться сывороткой крови крупного рогатого скота нормальной. Индекс нейтрализации – не менее 100.

Для испытания параллельно готовят 2 ряда разведений вируса в диапазоне (1:5) – (1:50000) с кратностью разведения 10. В качестве среды разведения используют 2 % раствор сыворотки крови лошади нормальной, приготовленный с применением стерильной воды очищенной или воды для инъекций. Сыворотку крови лошади нормальную предварительно инактивируют при температуре 56 °С в течение 30 мин. Для получения разведений вируса в первую пробирку каждого ряда, соответствующую разведению 1:5, вносят 0,4 мл среды разведения, в остальные пробирки ряда– по 0,45 мл среды разведения. В первую пробирку каждого ряда добавляют по 0,1 мл восстановленной суспензии вируса бешенства штамм «Внуково-32» и тщательно перемешивают содержимое пробирок. Далее готовят ряд последовательных разведений путем переноса 0,05 мл смеси из предыдущей пробирки в следующую пробирку, каждый раз используя новую пипетку. Из последней пробирки, соответствующей разведению 1:50000, удаляют 0,05 мл смеси. В результате конечный объем содержимого каждой пробирки составит 0,45 мл смеси.

В каждую пробирку первого ряда вносят по 0,45 мл иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади, в каждую пробирку второго ряда –по 0,45 мл сыворотки крови крупного рогатого скота нормальной, инактивированной при температуре 56 °С в течение 30 мин. В результате

получают 2 ряда разведений вируса бешенства штамм «Внуково-32» в диапазоне от 10^{-1} до 10^{-5}. Содержимое пробирок осторожно перемешивают путем встряхивания и инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (75 ± 15) мин. Затем пробирки быстро охлаждают на льду до комнатной температуры и каждым разведением вируса бешенства в объеме 0,03 мл интрацеребрально заражают по 6 беспородных мышей массой 9–10 г. За животными наблюдают 14 дней. Мышей, павших в течение первых 4 дней, при расчетах не учитывают. Титр вируса, использованного для заражения каждой из 2 групп мышей, вычисляют по методу Рида и Менча. Индекс нейтрализации рассчитывают путем вычитания логарифма обратного разведения, соответствующего LD_{50} вируса в смеси с иммуноглобулином антирабическим из сыворотки крови лошади, из логарифма обратного разведения, соответствующего LD_{50} вируса в смеси с сывороткой крупного рогатого скота нормальной. Если полученная разница превышает 2, то индекс нейтрализации больше 100.

Стерильность. Не должен содержать бактерий, в том числе микобактерий туберкулеза, и грибов. Испытание на отсутствие бактерий и грибов проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Испытание на отсутствие микобактерий туберкулеза проводят путем посева на среду Левенштейна-Йенсена.

Присутствие микоплазм. Не должен содержать микоплазм**.** Испытание проводят микробиологическим методом в соответствии с ОФС «Испытание на присутствие микоплазм».

Посторонние вирусные агенты. Не должен содержать посторонних вирусных агентов по результатам испытания на 20 мышах-сосунках, испытания на 20 беспородных белых мышах массой 15–20 г, испытания на 5 морских свинках массой 350 – 500 г, испытания на культурах клеток.

Используют здоровых животных, на которых ранее не проводили какие-либо испытания. Мышам-сосункам вводят по 0,01 мл испытуемого образца интрацеребрально и по 0,1 мл интраперитонеально, период

наблюдения – 14 сут. Беспородным белым мышам вводят по 0,03 мл испытуемого образца интрацеребрально и по 0,5 мл интраперитонеально, период наблюдения – 28 сут. Морским свинкам вводят по 0,1 мл испытуемого образца интрацеребрально и по 5 мл интраперитонеально, период наблюдения – 42 сут.

Инфекционный титр вируса. Не менее 10^{-6} LD_{50}/мл при интрацеребральном заражении новорожденных беспородных белых мышей массой 6–8 г.

Специфическая активность. Не менее 1,0 МЕ. Определение проводят методом NIH (раздел «Испытания готового продукта»).

Испытания культур клеток

Для производства вакцины используют первичную культуру клеток почек сирийских хомячков. Почки для получения культуры клеток забирают у клинически здоровых хомячков.

При работе с культурами клеток запрещается использовать антибиотики группы пенициллинов.

Необходимо проводить испытания производственной культуры клеток на стерильность и на отсутствие посторонних вирусных агентов путем изучения феномена гемадсорбции и цитопатических изменений на чувствительных тест-системах: культуре клеток, используемой для производства вакцины, культуре клеточной линии из другого источника, культуре диплоидных клеток человека.

При наличии гемадсорбции и (или) цитопатических изменений в контрольных культурах опыт следует повторить в клеточной культуре другой партии.

Если при повторном исследовании контрольных клеточных культур в одном из испытаний обнаружены цитопатические изменения или феномен гемадсорбции, то вирус, полученный в соответствующих зараженных культурах, не должен быть использован для производства вакцины.

Федеральный ЭМДЕ
медицинская библиотека

Все вещества животного происхождения, используемые для получения производственной культуры клеток и культивирования вируса бешенства, проверяют на отсутствие бактерий, грибов, микоплазм и посторонних вирусных агентов. Для размножений клеток не следует применять сыворотки человеческого происхождения.

Производство полуфабриката

Все этапы производства должны быть валидированы.

Методы концентрации и очистки вируссодержащей жидкости указывают в нормативной документации. Допускается концентрация и очистка методом ультрафильтрации или концентрация методом ультрафильтрации с последующей очисткой методом гель-хроматографии.

Инактивацию проводят сразу после этапа очистки. При использовании физического метода инактивации отрабатывают режим инактивации: скорость подачи вируссодержащей жидкости, частоту вращения диска инактиватора, интенсивность излучения.

Вспомогательные вещества

Запрещается использовать в производстве антибиотики после технологического этапа сбора вируссодержащей культуральной жидкости.

В качестве стабилизаторов используют разрешенные вещества, указанные в нормативной документации.

Испытания промежуточных продуктов

Испытание полуфабриката на стерильность проводят на стадии получения объединенного полуфабриката после этапа концентрации и очистки (до инактивации), после этапа инактивации, после добавления в вакцину стабилизаторов (испытывают смесь для лиофилизации), в процессе розлива.

Испытание полуфабриката на отсутствие микоплазм проводят на стадии получения объединенного полуфабриката после этапа концентрации и очистки (до инактивации), после этапа инактивации.

При использовании дополнительного метода инактивации формальдегидом в полуфабрикате определяют остаточное количество формальдегида. Содержание формальдегида в полуфабрикате – не более 60 мкг/мл.

Испытание полуфабриката на содержание общего белка проводят до добавления стабилизаторов – сахарозы и желатина. Содержание общего белка в полуфабрикате должно быть от 4,7 до 5,0 мг/мл. Определение проводят методом Лоури в соответствии с ОФС «Определение белка».

По показателю «Герметичность» испытывают все ампулы серии. Для проведения испытания ампулы помещают в кассеты, заполненные водой, подкрашенной любым водно-растворимым красителем. Кассеты погружают таким образом, чтобы ампулы полностью находились в воде. Емкость герметично закрывают и создают в ней избыточное давление, по сравнению с атмосферным, – (100 ± 20) кПа. Давление выдерживают не менее 15 мин, после чего устанавливают в емкости давление, равное атмосферному. Емкость открывают, кассеты с ампулами вынимают и просматривают на наличие в них подкрашенной воды. Ампулы, содержащие подкрашенную воду, считают не выдержавшими испытание.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Пористая масса белого цвета, гигроскопична. Определяют визуально.

Подлинность. Вакцина должна вызывать специфический иммунитет к вирусу бешенства при иммунизации мышей. Испытание проводят одновременно с испытанием специфической активности. Определение проводят по разделу «Специфическая активность».

Время растворения. Должна полностью растворяться в течение 5 мин при внесении 1 мл растворителя (вода для инъекций) на 1 дозу вакцины. Определение проводят визуально.

Прозрачность. Прозрачная или слабо-опалесцирующая жидкость, не более эталона I. Определение проводят визуально в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Степень окраски жидкостей. Не более эталона Y_4. Определение проводят визуально в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH раствора. От 7,2 до 7,8. Определяют потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Потеря в массе при высушивании. Не более 2,0 %. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Альбумин бычий сывороточный (БСА). Не более 0,5 мкг в 1 дозе. Определяют методом ракетного иммуноэлектрофореза в соответствии с ОФС «Определение бычьего сывороточного альбумина методом ракетного иммуноэлектрофореза в иммунобиологических лекарственных препаратах». В качестве антисыворотки допускается использовать сыворотку, преципитирующую белки сыворотки крови рогатого скота адсорбированную кроличью диагностическую для судебно-медицинских целей жидкую. Чувствительность сыворотки определяют предварительно и используют в концентрации, при которой с 0,5 мкг/мл БСА образуется четкая ракета с высотой пика не менее 1 мм.

Стерильность. Должна быть стерильной. Испытание на отсутствие бактерий и грибов проводят методом прямого посева или мембранной фильтрации на тиогликолевой среде в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность. Должна быть апирогенной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Доза препарата для введения составляет 1 прививочную дозу, вводимую внутривенно в объеме 1 мл.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Аномальная токсичность. Должна быть нетоксичной. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Морским свинкам вводят по 2 мл восстановленной растворителем вакцины подкожно, мышам – по 1 мл восстановленной растворителем вакцины внутрибрюшинно.

Специфическая безопасность. Вакцина не должна содержать живой вирус бешенства.

Для определения специфической безопасности проводят пассаж вакцины в первичной культуре клеток почек сирийских хомячков. В 2 флакона, содержащие питательную среду с гидролизатом лактальбумина (0,5 %) в растворе Хенкса для культур клеток, вносят по 200 мл клеточной взвеси, содержащей 300–600 тыс клеток/мл. В среду добавляют 10 % раствор сыворотки крови крупного рогатого скота жидкой.

В качестве контроля используют 2 флакона с незараженной первичной культурой клеток почек сирийских хомячков.

Объем и концентрация клеток, вносимых в опытные и контрольные флаконы, должны быть одинаковыми.

Культуру инкубируют в течение 5–6 сут при температуре (36 ± 1) °С. Затем отбирают флаконы с полностью сформировавшимся клеточным монослоем. Для испытания на специфическую безопасность от каждой серии отбирают по 25 ампул с препаратом. В каждую ампулу вносят по 1 мл растворителя. Восстановленную вакцину объединяют в одну емкость. Из отобранных флаконов с культурой клеток сливают культуральную жидкость. В каждый опытный флакон вносят по 12,5 мл растворенной вакцины, 2 незараженных флакона оставляют (контрольные). Все флаконы инкубируют при температуре (36 ± 1) °С в течение 90 мин, после чего в опытные и контрольные флаконы вносят по 200 мл питательной среды с гидролизатом лактальбумина (0,5 %) в растворе Хенкса для культур клеток. В поддерживающую среду добавляют 5 % СКРС и канамицин до конечной концентрации 100 мкг/мл или 4 % раствор для инъекций гентамицина

сульфата до конечной концентрации 80 мкг/мл. На –8 сут инкубации при температуре (32 ± 1) °С из каждого опытного флакона отбирают по 5 мл культуральной жидкости, смешивают пробы и вводят в головной мозг по 0,03 мл смеси 10 беспородным мышам массой от 6 до 7 г.

Аналогично испытывают культуральную жидкость из контрольных флаконов.

За животными наблюдают 21 сут. За весь период наблюдения не должно регистрироваться ни одного случая смерти от бешенства животного, получившего культуральную жидкость из опытных флаконов. Диагноз устанавливают на основании результатов иммунофлуоресценции (РИФ).

В случае, если в опытной группе зарегистрирована неспецифическая гибель (в первые 4 сут наблюдения) более 2 мышей, испытание повторяют.

При появлении хотя бы у 1 мыши клинических признаков бешенства (тремор конечностей, атаксия, паралич) или при гибели более 2 мышей без клинических признаков заболевания, начиная с 5 сут наблюдения, головной мозг павших животных исследуют методом иммунофлуоресценции. При получении положительных результатов серию считают не выдержавшей испытания; при получении отрицательного результата проводят повторный контроль на удвоенном количестве образцов вакцины и удвоенном количестве мышей.

В случае отрицательного результата при повторном испытании считают, что вакцина не содержит живого вакцинного вируса бешенства. В случае регистрации при повторном контроле хотя бы у 1 мыши клинических признаков бешенства, подтвержденного иммунофлуоресценцией, испытуемую серию вакцины считают не выдержавшей испытания.

Специфическая активность. Не менее 2,5 Международных Единиц (МЕ) в 1 дозе.

Определение специфической активности проводят по методике Национального института здоровья США (NIH). Специфическую активность испытуемой вакцины определяют в сравнении со стандартным образцом

(СО) специфической активности вакцины антирабической культуральной концентрированной очищенной инактивированной, калиброванным по отношению к Международному стандарту антирабической вакцины. Для определения специфической активности от серии отбирают не менее 3 ампул на каждую иммунизацию.

В каждую ампулу вносят растворитель из расчета 1 мл на 1 дозу вакцины. Полученные растворы объединяют и готовят ряд разведений с пятикратным интервалом в соотношении 1:5; 1:25; 1:125; 1:625; 1:3125 на 0,9 % стерильном растворе натрия хлорида или на среде 199, содержащей 0,1 % альбумина. Разведения, используемые для иммунизации животных, указывают в нормативной документации.

Аналогичным образом готовят разведения стандартного образца, предварительно восстановленного водой для инъекций до содержания 1 МЕ в 1 мл.

Пробирки с разведенной вакциной и стандартным образцом хранят на льду в течение времени постановки опыта, но не более 4 ч.

Для иммунизации используют мышей линии Balb/c или беспородных мышей массой (12 ± 2) г без различия пола. Каждым разведением вакцины и стандартного образца иммунизируют не менее 11 животных; 40 мышей из этой же партии (контрольная группа) содержат в отдельных клетках до проведения титрования фиксированного вируса бешенства штамм «CVS» (тест-штамм). Мышей иммунизируют внутрибрюшинно по 0,5 мл 2 раза с интервалом 7 сут. На 7 сут после второй иммунизации вводят фиксированный вирус бешенства штамм CVS интрацеребрально в объеме 0,03 мл шприцем вместимостью 1 $см^3$. Для заражения всех иммунизированных животных применяют разрешающее (рабочее) разведение вируса бешенства, содержащее от 20 до 100 LD_{50}/0,03 мл вируса.

Одновременно с заражением иммунизированных мышей на неиммунизированных мышах из контрольной группы проводят титрование

фиксированного вируса бешенства штамм CVS для определения точной дозы вируса, взятой в испытание. Для этого используют разрешающее (рабочее) разведение вируса (10^0) и его десятикратные разведения (10^{-1}; 10^{-2}; 10^{-3}) на 2 % растворе сыворотки крови лошади нормальной, приготовленном с применением стерильной воды очищенной или воды для инъекций. Сыворотку крови лошади нормальную предварительно инактивируют при температуре 56 ° С в течение 30 мин. Каждым разведением вируса заражают не менее чем по 10 мышей интрацеребрально в объеме 0,03 мл.

За мышами наблюдают в течение 14 сут. При оценке результатов опыта учитывают мышей, заболевших или павших с 5 по 14 сут. Учет проводят ежедневно. Клиническими симптомами на разных стадиях развития заболевания могут быть: взъерошенная шерсть, замедленные и/или круговые движения, дрожание, парез, параличи.

После окончания опыта вычисляют точное количество вируса, содержащееся в 0,03 мл разрешающего разведения, по методу Рида и Менча.

Рассчитывают конечные разведения вакцины и стандартного образца, защищающие 50 % животных ($КР_{50}$), по следующей формуле:

$$T = A + \frac{50 - B}{C - B} \cdot Д,$$

где: T – показатель степени десятичного логарифма;

A – логарифм обратной величины разведения, при котором смертность животных ниже 50 %;

B – показатель смертности животных ниже 50 %;

C – показатель смертности животных выше 50 %;

$Д$ – логарифм кратности разведения.

$$КР_{50}=10^{-T}$$

Специфическую активность испытуемой вакцины ($СА$) определяют в МЕ относительно специфической активности стандартного образца по формуле:

$$CA = \frac{K}{M} \cdot У \cdot 1,$$

где: K – величина, обратная $КР_{50}$ испытуемой вакцины;

M – величина, обратная $КР_{50}$ стандартного образца;

$У$ – количество МЕ в 1 мл восстановленного стандартного образца (1 МЕ);

1 – доза (1 мл).

В том случае, когда при проведении испытания специфическая активность вакцины менее нормативных требований, допускается проведение повторного испытания.

Термостабильность. Вакцина должна быть термостабильной. После инкубирования образцов при температуре 37 ºС в течение 4 недель специфическая активность вакцины должна быть не менее 2,5 МЕ в 1дозе (раздел «Специфическая активность»). Испытанию на «Термостабильность» подвергают не менее 2 серий вакцины ежегодно.

Растворитель, выпускаемый в комплекте с препаратом. В нормативной документации указывают растворитель и методику, по которой проводят испытания растворителя.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С в соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Федеральный электронный медицинский библиотека

Вакцина гепатита В рекомбинантная	**ФС.3.3.1.0026.15** **Взамен ФС 42-3438-97**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину гепатита В рекомбинантную, которая представляет собой поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg), серотипа ad или ay, полученный методом рекомбинантной ДНК, который очищен с помощью последовательно применяемых физико-химических методов и адсорбирован на алюминия гидроксиде, разрешенном для парентерального введения. Антиген продуцируется культурой генетически трансформированных дрожжевых клеток (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* или *Hansenula polymorpha*).

Вакцина предназначена для профилактики вирусного гепатита В.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство вакцины должно осуществляться с соблюдением установленных требований к правилам организации производства и контроля качества лекарственных препаратов, гарантирующим ее качество, стабильность и безопасность для человека.

Состав препарата вакцины. В 1 мл препарата содержится 20 мкг поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) и вспомогательные вещества: сорбент – алюминия гидроксид 0,5 мг; консервант – тиомерсал 50 мкг (возможен выпуск препарата без консерванта); компоненты фосфатно-солевого буферного раствора.

Производственный штамм. Производственный штамм –

рекомбинантный штамм дрожжей, продуцирующий HBsAg (указывают штамм-продуцент дрожжей и субтип вируса гепатита В). В нормативной документации производителя должны быть указаны полные характеристики рекомбинантного производственного штамма: клетки хозяина в сочетании с системой вектора экспрессии, отсутствие контаминирующих агентов; данные о стабильности плазмиды грибов в процессе хранения культуры.

Морфологические, культуральные и физико-биохимические свойства штамма-продуцента должны сохраняться при температуре минус (70 ± 1) °С в течение 1 г.

Характеристика субстанции

Степень чистоты субстанции должна быть охарактеризована с помощью методов определения доли потенциальных загрязняющих белков в общем белке препарата – методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) или с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Степень очистки HBsAg должна быть не менее 95 %. Количество остаточной ДНК дрожжевых клеток должно составлять не более 10 пг/доза.

Содержание HBsAg в субстанции определяют методом иммуноферментного анализа (ИФА). В качестве образца сравнения может использоваться высокоочищенный референс-препарат предприятия с известным содержанием HBsAg и белка. Образцы сравнения на основе продукта, содержащего консервант, не пригодны в случае испытания препаратов, не содержащих консервант.

Содержание липидов и углеводов должно определяться в субстанции (in balk) до процедуры адсорбции антигена на алюминия гидроксиде.

Пенициллин и другие антибиотики группы бета-лактамов не должны использоваться ни на одном из этапов производства.

В случае, когда при очистке субстанции используют моноклональные антитела (иммунологическая аффинная хроматография для очистки HBsAg), используемые антитела должны быть охарактеризованы и определена

степень их очистки.

Референс-препараты. Для определения иммуногенности рекомбинантных вакцин против гепатита В могут быть использованы препараты сравнения (референс – препараты) – аналогичные вакцины того же производства, представляющие собой часть серии, иммуногенная активность которой была подтверждена в тестах *in vivo.*

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Гомогенная суспензия белого с серым оттенком цвета без видимых посторонних включений, при отстаивании разделяющаяся на 2 слоя: верхний – бесцветная прозрачная жидкость, нижний – белый осадок. При встряхивании суспензия должна легко ресуспендироваться.

Подлинность. Препарат должен содержать белок, идентичный поверхностному антигену вируса гепатита В (HBsAg). Определение проводят методом ИФА с использованием коммерческих тест-систем для выявления HBsAg с чувствительностью не более 0,1 МЕ/мл в соответствии с инструкцией по применению (раздел «Специфическая активность»). Возможно определение подлинности методом электрофореза в ПААГ в редуцирующих условиях при окрашивании раствором серебра нитрата после десорбции белка согласно ОФС «Электрофорез» и ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле». При окрашивании геля раствором серебра нитрата должна выявляться основная полоса мономера с молекулярной массой (24 ± 2) кДа, а также может присутствовать дополнительная менее интенсивная полоса димера с молекулярной массой (45 ± 2) кДа.

Размер частиц. Суспензия вакцины должна свободно проходить в шприц через иглу № 0840. Определение проводят в соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

Время седиментационной устойчивости. Суспензия вакцины не должна расслаиваться в течение 5 мин после встряхивания. Определение проводят в соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH. От 6,4 до 7,4. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Извлекаемый объём. Должен быть не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Стерильность. Препарат должен быть стерильным. Испытания проводят методом прямого посева или мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность».

Бактериальные эндотоксины. Не более 30 ЕЭ/мл, если нет других указаний в нормативной документации производителя. Определение проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины» (Гель-тромб тест. Качественный анализ).

Пирогенность. Препарат должен быть апирогенным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Тест-доза — 0,5 мл на 1 кг массы кролика. Вводится внутривенно. Определение пирогенности является альтернативным определению бактериальных эндотоксинов.

Общий белок. Не более 25 мкг/мл. Определение проводят по методу Лоури с предварительной десорбцией белка в соответствии с ОФС «Определение белка колориметрическим методом (метод Лоури) в иммунобиологических лекарственных препаратах». Условия десорбции должны быть валидированы под конкретный препарат каждым производителем.

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичным. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Тест-доза для морских свинок – 1 мл (20 мкг) подкожно, для мышей – 1 мл (20 мкг) внутрибрюшинно. Наблюдение проводят в течение 7 сут.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Специфическая активность. Специфическую активность характеризуют, определяя содержание HBsAg методом ИФА или иммуногенную активность в тестах *in vivo* на мышах.

Определение содержания HBsAg методом ИФА. Содержание HBsAg должно быть не менее 80 % по отношению к препарату сравнения. В качестве препарата сравнения используют референс-вакцину фирмы-производителя. Определение проводят в соответствии с ОФС «Метод иммуноферментного анализа» с использованием коммерческих тест-систем для выявления HBsAg с чувствительностью не ниже 0,1 МЕ/мл в соответствии с инструкцией по применению.

Процедура приготовления растворов для разведений и рабочие разведения должны быть валидированы для конкретного препарата каждым производителем.

Определение содержания HBsAg в испытуемом образце вакцины проводят параллельно с определением содержания антигена в референс-вакцине фирмы-производителя. Процент содержания антигена в испытуемом препарате должен быть определен нормативной документацией. Испытания осуществляют в соответствии с инструкцией по применению используемой тест-системы.

Учет результатов. Содержание HBsAg в испытуемой вакцине и в образце сравнения рассчитывают методом параллельных линий (программа «PARALINE» или аналогичная). В результате автоматического дисперсионного анализа получают значения относительной активности поверхностного антигена по отношению к референс-препарату в процентах.

Иммуногенная активность на мышах (тест in vivo). Вакцина должна стимулировать выработку антител к HBsAg у однократно иммунизированных мышей линии Balb/c. Отношение дозы иммуногенной активности референс-препарата вакцины гепатита В, вызывающей выработку антител у 50 % мышей ($ЕД_{50}$ референс-препарата), к $ЕД_{50}$ испытуемой вакцины должно быть не менее 0,5.

В качестве препарата сравнения используют референс-препарат производителя.

Раствор для разведения образцов вакцины – 0,9 % раствор натрия хлорида, содержащий 0,35 – 0,65 мг/мл алюминия гидроксида. Данный раствор используют и при иммунизации животных в качестве отрицательного контроля.

Процедура приготовления образцов отрицательного контроля, испытуемой вакцины и референс-препарата для иммунизации мышей, а также количество животных должны быть описаны в нормативной документации производителя. Животным вводят внутрибрюшинно по 1 мл соответствующего разведения исследуемого препарата, референс-вакцины и отрицательного контроля.

Через 28 – 30 дней животных обескровливают. Полученные индивидуально от каждого животного сыворотки анализируют на наличие антител методом ИФА с использованием тест-систем для количественного определения антител к поверхностному антигену вируса гепатита В с чувствительностью 5 – 10 мМЕ/мл в соответствии с инструкцией по применению.

Учет результатов. Вычисляют среднее арифметическое значение оптической плотности сывороток невакцинированной группы животных (отрицательный контроль). Положительными считают сыворотки, показания оптической плотности которых равны или выше среднего арифметического отрицательного контроля плюс коэффициент тест-системы. Для каждой группы мышей вычисляют процент эффективности (показатель сероконверсии (ПСК) в %) по формуле:

$$\frac{\text{количество сероположительных мышей в группе}}{\text{общее количество мышей в группе}} \cdot 100$$

Методом пробит-анализа или методом скользящих средних на основании ПСК рассчитывают $ЕД_{50}$ испытуемой серии вакцины и референс-

образца. Находят отношение $ЕД_{50}$ референс-препарата к $ЕД_{50}$ испытуемой вакцины.

Полнота сорбции антигена. Количество несвязанного поверхностного антигена вируса гепатита В должно быть не более 1 % от номинального количества. Испытуемый образец вакцины в объеме 1000 мкл центрифугируют при 6000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре, если в частной фармакопейной статье не даны другие указания. В качестве референс-препарата используют несорбированный HBsAg с известной концентрацией. Процедура разведения надосадочной жидкости, референс-препарата и буфер для разведений должны быть валидированы для конкретного препарата каждым производителем.

Определение несвязанного поверхностного антигена в надосадочной жидкости проводят методом ИФА с использованием коммерческих тест-систем для выявления HBsAg с чувствительностью не ниже 0,1 МЕ/мл по отношению к референс-препарату. Количество несвязанного поверхностного антигена вируса гепатита В определяют по калибровочному графику референс-образца, используя программу «PARALINE» или аналогичную, либо полноту сорбции (X) в процентах рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A \cdot F_{1\ \text{разведения}}}{B \cdot F_{2\ \text{разведения}}} \cdot 100,$$

где: A – среднее значение оптической плотности надосадочной жидкости;

B – среднее значение оптической плотности референс препарата;

$F_{1\ \text{разведения}}$ – фактор разведения надосадочной жидкости.

$F_{2\ \text{разведения}}$ – фактор разведения референс препарата.

Тиомерсал. От 0,03 до 0,07 мг в 1 мл вакцины и от 0,018 до 0,035 мг в 0,5 мл вакцины. Определение проводят колориметрическим или атомно-абсорбционным методом в соответствии с ОФС «Количественное определение тиомерсала в иммунобиологических лекарственных

препаратах».

Алюминия гидроксид. От 0,35 до 0,65 мг в 1 мл и от 0,18 до 0,32 мг в 0,5 мл вакцины. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение ионов алюминия в сорбированных иммунобиологических лекарственных препаратах».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты». Маркировка вторичной упаковки должна содержать предупредительные надписи: «Перед употреблением встряхивать», «Хранить в не доступном для детей месте», «Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений», «Не замораживать».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Вакцина гриппозная живая	**ФС.3.3.1.0027.15**
	Взамен ФС 42-3569-98

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину гриппозную аллантоисную живую, которая представляет собой аттенуированные реассортантные вирусы гриппа типов А и В, полученные из вируссодержащей аллантоисной жидкости, выращенные раздельно на развивающихся куриных эмбрионах. Препарат лиофильно высушен со стабилизатором. Препарат вызывает формирование специфического иммунитета против гриппа.

Вакцина предназначена для специфической профилактики гриппа.

ПРОИЗВОДСТВО

Штаммовый состав вакцин ежегодно рекомендуется ВОЗ и национальной Комиссией по гриппозным вакцинным и диагностическим штаммам.

Куриные эмбрионы должны быть получены из птицехозяйств, благополучных по возбудителям, патогенным для человека. Качество поставляемых эмбрионов должно быть подтверждено ветеринарными свидетельствами.

Все этапы производства вакцины должны осуществляться с соблюдением установленных требований к правилам организации производства и контролю качества лекарственного препарата, гарантирующих его качество и безопасность для человека, в помещениях,

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

исключающих работу с другими патогенными микроорганизмами и антибиотиками. Не допускается производство препарата на территории, на которой расположены производственные здания по производству антибиотиков, если не соблюдены требования к защитным зонам, согласно действующим санитарным правилам. Обязательным условием технологического процесса производства вакцины является соблюдение поточности, исключающей возможность перекреста промежуточных продуктов и полуфабрикатов, получаемых на разных стадиях производства, и их контаминацию посторонними веществами, в первую очередь посторонней микрофлорой. В производственных помещениях запрещается работа с другими вирусами гриппа, кроме вакцинных. Сотрудники, работающие на производстве живой гриппозной вакцины, не должны контактировать с другими инфекционными агентами в течение того же рабочего дня.

Все производственные процессы, технологическое оборудование и методы контроля должны быть валидированными. Качество исходного сырья и материалов, используемых в производстве должно быть подтверждено соответствующими документами (допустимо использование компонентов только фармакопейного качества). В состав вакцины должны входить вспомогательные компоненты, стабилизаторы, не снижающие эффективности вакцины, разрешенные к медицинскому применению в дозах, не вызывающих токсические, аллергические или иные нежелательные реакции у человека.

Производство вакцины включает несколько стадий с обязательным внутрипроизводственным контролем: получение посевного вируса; накопление вируса; объединение его со стабилизатором; лиофилизация; с указанием название защитного газа, используемого при запайке ампул, производство лекарственной формы препарата; маркировку; фасовку. На каждой стадии должны быть предусмотрены: система и схема анализа показателей качества в ходе технологического процесса и испытания

конечного продукта; хранение промежуточных и конечного продуктов, обеспечивающее стабильность качества в течение срока годности продукта.

На этапах производства необходимо контролировать:

– Качество сырья: 9–11 – дневных куриных эмбрионов. Из каждой партии 2 % эмбрионов, использованных для приготовления вируса, без заражения инкубируют одновременно с зараженными эмбрионами. Их аллантоисная жидкость испытывается на наличие гемагглютинирующих агентов. Эмбрионы следует брать из изолированных групп птиц, постоянно контролируемых в отношении отсутствия целого ряда инфекций и антител к следующим возбудителям: аденовируса птиц 1-ой группы (*Celo, Phelps*), аденовируса птиц 3-ой группы (*B8/78*), аденовируса птиц 4-ой группы (*KR–95*), энцефаломиелита птиц (*Van Roakel*), гриппа птиц (видовой) тип А (*H1–H15*), парамиксовируса птиц (тип 2) (*Yucaipa*), реовируса птиц (1133), пневмовируса (*UK*), туберкулеза птиц (*Mycobacterium avium intracellulare*), вируса анемии цыплят (*DelRose*), оспы птиц (*Кучинский*), инфекционного бронхита (*Massachusetts*), инфекционного бурсита (*Winterfild 2515*), инфекционного ларинготрахеита (*Cover*), лейкоза птиц (антитела *HC-1*), вирусов лимфоидного лейкоза (*p27*) (*A, B, C, D, E, J*), болезни Марека – серотипы 1, 2 и 3 (*SB-1/HVT*), микоплазмоза птиц (*Mycoplasma gallisepticum*), болезни Ньюкасла (*La-Sota*), гемофиллеза (*Haemophilus paragallinarum*), сальмонеллеза (род *Salmonella*), пастереллеза (*Pasteurella multocida*), орнитобактериоза (*Ornithobacterium rhinotracheale).*

– Производственные штаммы: используются аттенуированные, реассортантные штаммы вируса гриппа типа А и В. Источник и история пассажей должны быть известны. Вакцинный вирус должен быть генетически стабильным, иммуногенным, не передаваться восприимчивым индивидуумам и иметь соответствующие лабораторные маркеры аттенуации. Его иммуногенность и безопасность для человека должны быть предварительно установлены. Продукция вакцины основывается на системе посевных вирусов (seed-lot). Из штамма готовится маточный материал или

главный посевной вирус, который должен храниться при температуре минус 70 °С в жидком виде или при температуре минус 20 °С в лиофильно высушенном виде. Штаммы и маточный материал должны быть проверены по всем биологическим свойствам в соответствии с регламентированными требованиями.

– Из маточного материала готовят рабочий посевной вирус. Финальный сбор представляет собой не более пятого пассажа от вакцинного вируса.

– Антибиотики: пенициллин или стрептомицин нельзя использовать ни на одной из стадий производства.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Аморфная масса от белого до светло-коричневого цвета. Определяют визуально.

Подлинность. Моновакцины должны взаимодействовать с соответствующими гомологичными типоспецифическими сыворотками и не взаимодействовать с сыворотками к другим типам и подтипам вируса гриппа. Титр с гетерологичной сывороткой должен быть ниже ее собственного титра, по крайней мере, в 4 раза. Определение проводят в полуфабрикатах (моновакцинах), лиофилизированных одновременно с трехвалентным препаратом, в реакции торможения гемагглютинации (РТГА).

Метод постановки РТГА с вирусом гриппа (макрометод). РТГА применяют для установления типа и подтипа вируса, т.е. специфичности, а также для определения нарастания титров специфических антител. Постановка РТГА включает следующие этапы работы: приготовление взвеси эритроцитов, определение гемагглютинирующего титра антигена в реакции гемагглютинации (РГА) и рабочей дозы вируса, постановка самой реакции. Для постановки реакции необходимы следующие ингредиенты:

– антиген (вакцина, вируссодержащая жидкость – аллантоисная или культуральная);

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

– иммунные сыворотки к различным серотипам вируса гриппа;

– фосфатный буферный раствор pH 7,2 ± 0,2;

– взвесь куриных эритроцитов, 1 %.

1. *Приготовление взвеси куриных эритроцитов*. Для постановки РТГА используют эритроциты петухов. Кровь у петухов берут из сердца или подкрыльцовой вены.

Свежеполученную кровь от 3–5 петухов помещают во флакон со стеклянными бусами или же с одним из антикоагулянтов (раствор Альсевера, 5% раствор натрия цитрата). Дефибринирование крови проводят немедленно путем интенсивного встряхивания флакона в течение 5–7 мин при температуре (20 ± 2) °С до выпадения волокон фибрина.

Дефибринированную кровь фильтруют через 4 слоя марли, затем трехкратно отмывают фосфатным буферным раствором (на 1 объем крови – 4 объема фосфатного буферного раствора) при центрифугировани (800 ± 200) об/мин в течение (15 ± 5) мин. Надосадочную жидкость удаляют. Из осадка, принимаемого за 100 %, готовят 1 % суспензию куриных эритроцитов по объему.

2. *Определение гемагглютинирующего титра антигена*. В круглодонных лунках плексигласового планшета готовят двукратные разведения антигена (титруемого вируса из испытуемой вакцины) в объеме 0,4 мл на фосфатном буферном растворе, начиная с 1:10 до 1:1280. В каждую лунку вносят по 0,4 мл 1 % суспензии эритроцитов. Содержимое лунок перемешивают встряхиванием планшеты и оставляют при температуре (20 ± 2) °С на 40–45 мин (до оседания эритроцитов в контроле).

Реакцию оценивают по «четырехкрестовой» системе. За титр антигена, или одну агглютинирующую единицу (АЕ), принимают наибольшее разведение антигена, дающее четко выраженную агглютинацию эритроцитов (+++ или ++++).

Определение титра антигена сопровождается отрицательным

контролем на отсутствие спонтанной агглютинации эритроцитов. С этой целью в контрольную лунку того же плексигласового планшета вносят 0,4 мл фосфатного буферного раствора и 0,4 мл 1 % суспензии эритроцитов. При отсутствии спонтанной агглютинации на дне лунки выпадает гомогенный с ровными краями осадок эритроцитов (отрицательная реакция).

3. *Приготовление рабочей дозы антигена*. В РТГА рабочей дозой антигена является то разведение антигена, в 0,2 мл которого содержится 4 агглютинирующие единицы (4 АЕ). Для ее вычисления следует установленную величину титра антигена разделить на 8. Полученная от деления цифра указывает во сколько раз нужно развести антиген, чтобы в 0,2 мл его содержалось 4 АЕ (рабочая доза).

Перед постановкой основного опыта проверяют точность приготовления рабочей дозы (4 АЕ). Для этого в пять лунок горизонтального ряда плексигласового планшета, начиная со второй, вносят по 0,2 мл фосфатного буферного раствора. В 1-ю и 2-ю лунки добавляют по 0,2 мл приготовленной рабочей дозы антигена. После перемешивания переносят 0,2 мл смеси из лунки в лунку, начиная со 2-й по 5-ю лунку, из 5-й лунки 0,2 мл удаляют. Затем в каждую лунку добавляют по 0,2 мл фосфатного буферного раствора и по 0,4 мл 1 % суспензии куриных эритроцитов. В 6-й лунке ставят контроль на отсутствие спонтанной агглютинации эритроцитов. После встряхивания смесь оставляют при температуре (20 ± 2) °С на 40–45 мин (до оседания эритроцитов в контроле).

При правильном выборе рабочей дозы полная (++++) агглютинация эритроцитов должна наблюдаться только в первых трех лунках. В 4-й и 5-й лунках агглютинация должна отсутствовать. В случае отклонения от указанного выше, разведение антигена должно быть изменено путем добавления соответствующего количества антигена или фосфатного буферного раствора для получения необходимой рабочей дозы. При этом необходимо повторно проверить правильность приготовления рабочей дозы.

4. *Постановка реакции торможения гемагглютинации.* Сыворотки,

используемые в РТГА, могут содержать неспецифические ингибиторы гемагглютинации. Поэтому для их удаления перед постановкой РТГА сыворотки необходимо обработать нейраминидазой холерных вибрионов или RDE-реагентом (Примечания).

После удаления неспецифических ингибиторов готовят двукратные разведения сывороток в лунках плексигласовой доски, начиная с 1:10 до 1:640 и выше в объеме 0,2 мл. К каждому разведению сыворотки добавляют по 0,2 мл рабочей дозы антигена (4 АЕ). Смесь встряхивают и после контакта антигена и сыворотки (от 30 мин до 1 ч) при температуре (20 ± 2) °С в каждую лунку добавляют по 0,4 мл 1 % суспензии куриных эритроцитов. Смесь повторно встряхивают, оставляют при температуре (20 ± 2) °С в течение 40–45 мин (до оседания эритроцитов в контроле), после чего производят учет результатов реакции.

При наличии специфических антител в сыворотке наступает задержка агглютинации эритроцитов. За титр сыворотки принимают предельное разведение, вызывающее полную задержку гемагглютинации.

Задержка гемагглютинации указывает на соответствие типа антигена и взятой сыворотки; отсутствие задержки гемагглютинации свидетельствует о несоответствии типа взятой сыворотки.

Примечания.

1. Удаление неспецифических ингибиторов гемагглютинации из иммунных сывороток с помощью нейраминидазы холерных вибрионов или RDE-реагентом. При наличии инструкции по применению коммерческого реактива необходимо следовать требованиям, изложенным в данном документе. Метод основан на способности нейраминидазы холерных вибрионов, не действуя на специфические антитела, разрушать ингибиторы гемагглютинации к вирусам гриппа А и В в сыворотках крови человека, кур, крыс, кролика.

К 1 объему сыворотки добавляют 3 объема реагента нейраминидазы. К смеси, состоящей из 0,1 мл сыворотки и 0,3 мл реагента нейраминидазы добавляют 0,6 мл фосфатного буферного раствора для получения разведения сыворотки 1:10. Далее смесь инкубируют при температуре (37 ± 2) °С в течение 18 – 20 час и затем прогревают при температуре (56 ± 2) °С в течение 30 мин. Сыворотка, обработанная нейраминидазой, может быть использована для постановки РТГА в течение 2 недель при условии ее хранения при

температуре (5 ± 1) °С.

2. Приготовление 0,1 М раствора фосфатного буферного pH 7,2 ± 0,2.

Раствор 1. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 17,8 г натрия фосфата двузамещенного 2 – водного ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$), растворяют в 500 мл воды очищенной, доводят объём раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Раствор 2. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 15,6 г натрия фосфата однозамещённого 2–водного ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$), растворяют в 500 мл воды очищенной, доводят объём раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносят 720 мл раствора 1, прибавляют 280 мл раствора 2 и перемешивают. Затем в мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 100 мл приготовленного 0,1 М фосфатного буферного раствора доводят объём раствора водой очищенной до метки, перемешивают, прибавляют 8,5 г натрия хлорида и вновь перемешивают. pH полученного раствора должен быть 7,2 ± 0,05. Если показатель pH выше или ниже требуемого, его соответственно доводят 1 М раствором хлористоводородной кислоты или 1 М раствором натрия гидроксида.

Приготовление раствора Альсевера.

Состав:

- 2,05 % глюкозы;
- 0,42 % натрия хлорида;
- 0,8 % натрия цитрата;
- 100,0 мл воды очищенной

pH раствора доводят с помощью 5 % раствора лимонной кислоты до pH 5,6 (примерно 10 мл 5 % раствора лимонной кислоты на 1 л раствора Альсевера). Раствор стерилизуют фильтрацией или автоклавированием в течение 3 последовательных дней при температуре 100 °С и давлении 0,7 атм. Для консервирования раствора добавляют на 1 мл крови 1,2 мл раствора Альсевера. В данном растворе эритроциты можно хранить при температуре (4 ± 2) °С в течение 1–2 нед. Перед употреблением эритроциты необходимо трехкратно отмыть фосфатным буферным раствором с помощью центрифугирования при (800 ± 200) об/мин в течение 10 мин.

3.Приготовление консервирующего 5 % раствора натрия цитрата. 5% раствор натрия цитрата перед использованием разводят в 2 раза 0,1 М фосфатным буферным раствором. К одной части полученного раствора натрия цитрата добавляют 2 части крови петухов. В данном растворе эритроциты могут храниться при температуре (4 ± 2) °С в течение 3 – 5 сут.

Метод постановки РТГА с вирусом гриппа (микрометод). Принцип метода, его учет и ингредиенты для реакции, проводимой микрометодом, те

же, что и для проведения РТГА макрометодом. Отличие методов заключается в изменении концентрации и объемов ингредиентов.

Реакцию ставят на микропанели с «U»-образными лунками.

1. Приготовление 0,5 % взвеси куриных эритроцитов. Взвесь готовят из 1 % суспензии эритроцитов (макрометод) разведением ее в 2 раза фосфатным буферным раствором (в соотношении 1:1).

2. Определение гемагглютинирующего титра антигена. В каждую лунку микропанели одного ряда вносят фосфатный буферный раствор в объеме 50 мкл. Затем в первую лунку вносят 50 мкл антигена в разведении 1:10 и далее проводят титрование по принципу двукратного разведения. Из последней лунки удаляют 50 мкл. Затем в каждую лунку вносят по 50 мкл 0,5 % суспензии эритроцитов. Содержимое лунок перемешивают встряхиванием и оставляют при комнатной температуре на 40 – 45 мин до оседания эритроцитов в контроле.

Реакцию оценивают по «четырехкрестовой» системе. За титр антигена, или одну агглютинирующую единицу (АЕ), принимают наибольшее разведение антигена, дающее четко выраженную агглютинацию эритроцитов (+++ или ++++).

Определение титра антигена сопровождается постановкой отрицательного контроля на отсутствие спонтанной агглютинации эритроцитов. В качестве отрицательного контроля служат несколько лунок панели, в которые вместо антигена внесен фосфатный буферный раствор.

3. Приготовление рабочей дозы антигена. Рабочая доза антигена при постановке РТГА микрометодом равна 8 АЕ. Для её приготовления гемагглютинирующий титр делят на 16. Полученное значение указывает во сколько раз необходимо развести антиген.

Пример разведения антигена: титр антигена равен 160. Разделив 160 на 16, получается цифра 10, указывающая на то, что антиген необходимо развести в 10 раз.

Перед постановкой основного опыта проверяют точность приготовления рабочей дозы (8 АЕ). Для этого в шесть лунок микропанели, начиная со второй, вносят по 25 мкл фосфатного буферного раствора. В 1 и 2 лунки добавляют по 25 мкл приготовленной рабочей дозы антигена. После перемешивания 25 мкл смеси переносят из 2 лунки в 3, из 3 – в 4 и т.д. Из последней лунки панели 25 мкл удаляют. Затем во все лунки добавляют по 25 мкл фосфатного буферного раствора и по 50 мкл 0,5 % суспензии эритроцитов. После встряхивания смесь оставляют при температуре (20 ± 2) °С на 40 – 45 мин до оседания эритроцитов в контроле.

При правильном выборе рабочей дозы агглютинация эритроцитов должна наблюдаться только в четырех лунках панели. В остальных лунках агглютинация должна отсутствовать. В случае отклонения от указанного результата добавляют антиген или фосфатный буферный раствор для получения необходимой рабочей дозы.

4. Постановка реакции торможения гемагглютинации. Метод постановки реакции микрометодом соответствует таковому, описанному для макрометода, за исключением объемов используемых ингредиентов реакции.

Готовят двукратные разведения сыворотки в объеме 25 мкл, вносят рабочую дозу антигена (8 АЕ) в объеме 25 мкл и после контакта антигена и сыворотки (от 30 мин до 1 ч) при температуре (20 ± 2) °С в каждую лунку панели вносят по 50 мкл 0,5 % взвеси эритроцитов. После оседания эритроцитов в контроле (как правило, через 40 – 45 мин) проводят учет результатов (макрометод).

За титр сыворотки принимают величину обратную ее разведению, при котором отсутствует агглютинация эритроцитов.

ИСПЫТАНИЯ ЛИОФИЛИЗИРОВАННОГО ПРЕПАРАТА

Время растворения. Содержимое ампулы должно полностью раствориться в течение 3 мин при встряхивании в 0,5 мл воды. Определение проводят визуально.

Потеря в массе при высушивании. Не более 2,5 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

ИСПЫТАНИЯ ВОССТАНОВЛЕННОГО ПРЕПАРАТА

Описание. Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость.

Прозрачность. Должен быть прозрачным или выдерживать сравнение с эталоном, указанным в фармакопейной статье. Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности».

Цветность. Должен быть бесцветным или выдерживать сравнение с эталоном, указанным в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

pH. От 7,0 до 8,0. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Стерильность. Препарат должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Отсутствие посторонних вирусов, микоплазм, микобактерий туберкулеза. Препарат не должен содержать микоплазм, микобактерий туберкулеза, посторонних вирусов. Определяют в вируссодержащей аллантоисной жидкости до добавления стабилизатора в соответствии с ОФС «Испытание вирусных вакцин на присутствие посторонних агентов».

При контроле на наличие посторонних вирусов испытания проводятся на 3-х клеточных культурах и куриных эмбрионах. При нейтрализации вируса гриппа не следует использовать иммунные сыворотки птичьего, обезьяньего или человеческого происхождения. Вирус, используемый для получения гипериммунной сыворотки, должен быть получен либо на культуре клеток не птичьего происхождения, либо на куриных эмбрионах свободных от патогенов. Если используются куриные эмбрионы, они должны быть получены от других групп птиц, которые не использовались для получения исследуемого вируса.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Контроль на микоплазмы проводят с использованием питательной среды для выделения и культивирования микоплазм полужидкую (среда Каган) с использованием нормальной сыворотки крови лошади.

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Доза для мышей 0,5 мл внутрибрюшинно.

Специфическая активность. Препарат должен обладать инфекционной активностью не менее $10^{6,9}$ $ЭИД_{50}$/доза (эмбриональная инфекционная доза) для штаммов вируса гриппа типа А и не менее $10^{6,4}$ $ЭИД_{50}$/доза для штамма вируса гриппа типа В. Определение проводят в полуфабрикатах (моновакцинах), лиофилизированных одновременно с трехвалентным препаратом по методике, изложенной ниже.

Определение проводят на развивающихся куриных эмбрионах 10 – 12-дневного возраста.

Готовят десятикратные разведения вируса (вакцины) в 4,5 мл фосфатного буферного раствора pH от 7,0 до 7,4 (каждое разведение отдельной пипеткой. По 0,2 мл вируссодержащей жидкости из разведений от 10^{-5} до 10^{-7} (разведения могут меняться в зависимости от целей исследования и предполагаемой инфекционной активности вируса) вводят в аллантоисную полость, используя на каждое разведение по 4 эмбриона. Для заражения эмбрионов используют одноразовые шприцы или проводят заражение одним шприцом, начиная с большего разведения.

Эмбрионы инкубируют при температуре, указанной в паспорте на штамм, в течение 48 ч для вируса гриппа (моновакцины) типа А и 72 ч для вируса гриппа (моновакцины) типа В. По истечении срока инкубации отдельно из каждого эмбриона отбирают по 0,4 – 0,5 мл аллантоисной жидкости, помещают в 4 отдельные лунки плексигласовой доски. Затем в каждую лунку добавляют по 0,4 – 0,5 мл 1 % суспензии куриных эритроцитов. Через 30–40 мин контакта при температуре (20 ± 2) °С, после оседания эритроцитов в контроле, проводят учет гемагглютинации.

Федеральный электронный медицинский библиотека ЭЭМБ

Контрольное испытание: проводят, как описано выше, но вместо аллантоисной жидкости из куриного эмбриона в свободные 4 лунки панели вносят по 0,4 – 0,5 мл фосфатного буферного раствора (pH 7,2 ± 0,2).

Вычисление биологического титра проводят по методу Рида и Менча (табл.1).

Метод основан на логической предпосылке, что тканевая культура или животное, погибшие при заражении каким-либо разведением вируса, погибнет и при заражении любым более низким разведением.

Таблица 1 – Подсчет 50 % дозы ($ТЦД_{50}$) по методу Рида и Менча

Разведение вируса	Количество тест-объектов	Исходные данные		Кумулятивные данные		Процент гибели
		погибло	выжило	погибло	выжило	
10^{-5}	4	4	0	7	0	100
10^{-6}	4	2	2	3	2	60
10^{-7}	4	1	3	1	5	17
10^{-8}	4	0	4	0	9	0

На примере подсчёта 50 % дозы ($ТЦД_{50}$ – количество цитопатогенных доз) показано, что 50 % доза находится между разведениями вируса 10^{-6} и 10^{-7}.

Далее расчет величины разведения (X), которую необходимо прибавить к разведению непосредственно ниже 50 % дозы (в $\log_{10}$), производится по следующей формуле:

$$X = \frac{A - 50}{A - B}, \qquad (1)$$

где: A – процент гибели при разведении, непосредственно ниже искомой 50 % дозы (в данном случае 60 %);

B – процент гибели при разведении непосредственно выше искомой 50 % дозы (в данном случае 17 %).

Подставляя полученные значения в формулу 1, находим:

$$X = \frac{60 - 50}{60 - 17} = 0{,}23,$$

откуда титр вируса (в обратных $\log_{10}$) равен 6 + 0,23 = 6,23; т.е., одна $ТЦД_{50}$ или LD_{50} соответствует разведению вируса $10^{-6,23}$.

Если в титрование были взяты разведения вируса с интервалом 0,5 $\log_{10}$, то величину X в формуле 1 следует умножить на 0,5.

Поскольку при титровании вируса в пробирочных культурах обычно получаются четкие результаты и культуры со 100 % дегенерацией отделены от культур с полным отсутствием дегенерации всего одним разведением вируса, удобно пользоваться при подсчете титров по Риду и Менчу упрощенной схемой (табл.2).

Таблица 2 – Упрощенная схема подсчета титров по Риду и Менчу

Количество эмбрионов, зараженных разведением 10^{-n}	Количество эмбрионов с наличием гемагглютинации в аллантоисной жидкости	Титр вируса в lg
4	1	(n-1), 66
4	2	n, 0
4	3	n, 33
4	4	n, 50

Пример: 10^{-4} ++++

10^{-5} +++

10^{-6} - - -

Титр вируса в lg $ИД_{50}$/0,2 равен: n, 33 т.е. 5,33 $ИД_{50}$/0,2 мл.

Указание объема вирусной взвеси, вводимой при заражении эмбрионов, обязательно, так как величина инфекционной активности будет различной.

Для вычисления $ТЦД_{50}$ вируса в 1 мл исследуемой жидкости к показателю величины титра вируса в $\log_{10}$ прибавляют в зависимости от количества вируссодержащего материала, взятого для заражения одной культуры, соответствующие величины поправок (табл.3).

Таблица 3 – Величины поправок

Федеральная электронная медицинская библиотека

Объем материала в миллилитрах, взятого для заражения одной культуры	Величина поправки в единицах логарифма
0,1	1,0
0,2	0,7
0,25	0,6
0,3	0,52
0,4	0,4
0,5	0,3
0,6	0,22
0,7	0,16
0,8	0,1

Например, если во всех пробирочных культурах, зараженных по 0,2 мл материалом в разведении 10^{-4}, наблюдается цитопатогенный эффект, а в культурах, инокулированных разведением 10^{-6}, цитопатогенного эффекта не наблюдается (при инокуляции же разведением 10^{-5} цитопатогенный эффект отмечен в одной из четырех пробирок), то титр вируса в $\log_{10}$ будет равен $10^{4,66}$. Содержание же его в 1 мл будет равно $10^{5,36}$ $ТЦД_{50}$.

Иммуногенность. Препарат должен вызывать прирост гомологичных антигемагглютинирующих антител в сыворотке крови в 4 и более раз у не менее чем 60 % привитых людей для штаммов вируса гриппа типа А и у 40 % привитых людей для штамма вируса гриппа типа В. Определение проводят на группе из 50 человек с исходным титром антител не выше 1:16. Проводят контроль первых трёх серий при введении нового штамма.

Реактогенность. Препарат не должен вызывать повышение температуры выше 37,5 °С более, чем у 2 % привитых при проверке на группе из 50 человек в возрасте от 18 до 55 лет. Контролируют первые три серии при введении нового штамма.

Производственные штаммы. Вакцинные штаммы вирусов гриппа типа А и В рекомендованные ВОЗ, ЕС и Комиссией по гриппозным вакцинным и диагностическим штаммам должны соответствовать по антигенной структуре антигенной разновидности вирусов гриппа подтипов

A(H_1N_1), A(H_3N_2) и типа В на текущий эпидемический сезон, иметь известную историю пассажей и источник выделения.

Штаммы должны удовлетворять следующим требованиям:

– пройти не менее пяти пассажей на куриных эмбрионах и обладать инфекционной активностью не менее $10^{7,0}$ $ЭИД_{50}$/0,2 мл для типа А и $10^{6,5}$ $ЭИД_{50}$/0,2 мл для типа В;
– быть специфичными и соответствовать антигенной структуре циркулирующим вирусам гриппа в РТГА и РИНА (реакция ингибирования нейраминидазной активности);
– быть бактериологически стерильными, не содержать микоплазм, микобактерий туберкулеза и посторонних вирусов.
– быть нетоксичными для мышей;
– быть безвредными для людей, т.е. не вызывать повышение температуры выше 37,5 °С в течение 4 сут наблюдения более, чем у 2 % привитых с титром антител не выше 1:16 (при испытании на группе из человек, на которых проверяется иммуногенность);
– стимулировать прирост гомологичных антител в сыворотке крови в 4 и более раз у 70 % людей, привитых двукратно, и у 50 % людей, привитых однократно вакцинными штаммами типа А; у 50 % людей, привитых двукратно и 40 % людей, привитых однократно вакцинным штаммом типа В (при испытании на группе из 100 человек, из них не менее 40 человек с титром антител 1:8 и ниже).

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты». Вторичная (потребительская) упаковка, кроме общепринятых сведений, должна содержать сведения о субстрате культивирования, составе штаммов и эпидсезоне, для которого предназначен препарат.

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С в сухом месте.

Федеральный электронный медицинский библиотека ФЭМБ

Вакцина гриппозная инактивированная	**ФС.3.3.1.0028.15** **Взамен ВФС 42-265ВС-96**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину гриппозную инактивированную (вакцину цельновирионную, которая представляет собой цельный вирус; вакцину расщепленную (сплит-вакцину), которая состоит преимущественно из разрушенных вирусных частиц; вакцину субъединичную, которая содержит в основном поверхностные антигены вируса гриппа: гемагглютинин и нейраминидазу). Антигены получают из очищенного вируса или очищенных вирусов гриппа типов А и В, одного, двух или трех штаммов, выращенных раздельно в развивающихся куриных эмбрионах. Препарат вызывает формирование специфического иммунитета против гриппа, вызываемого соответствующими штаммами.

Вакцина предназначена для специфической профилактики гриппа.

Вакцина может содержать адъювант и консервант.

ПРОИЗВОДСТВО

Штаммовый состав вакцин ежегодно рекомендуется ВОЗ и национальной Комиссией по гриппозным вакцинным и диагностическим штаммам.

Куриные эмбрионы должны быть получены из птицеводческих хозяйств, благополучных по возбудителям, патогенным для человека. Качество поставляемых эмбрионов должно быть подтверждено ветеринарными свидетельствами.

Все производственные процессы, технологическое оборудование и методы контроля должны быть валидированны и должны осуществляться с соблюдением установленных требований к правилам организации производства и контроля качества лекарственного препарата, гарантирующих его качество и безопасность для человека. Производство вакцины должно проводиться в помещениях, исключающих работу с другими патогенными микроорганизмами и антибиотиками. Не допускается производство препарата на территории, на которой расположены производственные здания по производству антибиотиков, если не соблюдены требования к защитным зонам, согласно действующим санитарным правилам. Обязательным условием технологического процесса производства вакцины является соблюдение поточности, исключающей возможность перекреста промежуточных продуктов и полуфабрикатов, получаемых на разных стадиях производства, и их контаминацию посторонними веществами, в первую очередь посторонней микрофлорой.

Работа с живым и инактивированным вирусом должна проводиться в разных помещениях. Качество исходного сырья и материалов, используемых в производстве, должно быть подтверждено соответствующими документами (допустимо использование компонентов только фармакопейного качества). В состав вакцины должны входить вспомогательные компоненты, разрешенные к медицинскому применению и в дозах, не вызывающих токсические, аллергические или иные нежелательные реакции у человека.

Производство вакцины включает ряд последовательных стадий с обязательным внутрипроизводственным контролем: получение посевного вируса; накопление вируса; очистку и концентрацию; расщепление вируса (при необходимости); производство препарата; маркировку; фасовку. На каждой стадии должны быть предусмотрены: система и схема анализа показателей качества в ходе технологического процесса и испытания конечного продукта; хранение промежуточных и конечного продуктов, обеспечивающее стабильность качества в течение срока годности продукта.

На этапах производства необходимо контролировать:

- Качество сырья:10-12-дневных развивающихся куриных эмбрионов (возраст развивающихся куриных эмбрионов должен быть указан в соответствующем разделе нормативной документации).
- Производственные штаммы: используются высокорепродуктивные реассортанты. Источник и история пассажей должны быть известны. Продукция вакцины основывается на системе посевных вирусов (seed-lot). Из штамма готовится маточный материал или главный посевной вирус, который должен храниться при температуре минус 70 °С в жидком виде или при температуре минус 20 °С в лиофильно высушенном виде. Штаммы и маточный материал должны быть проверены по всем биологическим свойствам в соответствии с регламентированными требованиями.

  Из маточного материала готовят рабочий посевной вирус, который должен быть представлен не более чем 15 пассажем от соответствующего производственного штамма. Финальный сбор представляет собой первый пассаж от рабочего посевного вируса.
- Моновалентный вирусный сбор: Процесс инактивации должен обеспечивать инактивацию вируса лейкоза птиц и микоплазм. При использовании формальдегида его концентрация не должна превышать 0,2 г/л на любой стадии. Если используется бетапропилактон, его концентрация не должна превышать 0,1 % V/V. В сбор может быть добавлен антимикробный агент. Пенициллин или стрептомицин нельзя использовать ни на одной из стадий производства.

Для каждого нового штамма необходима валидация процесса расщепления вируса в моновалентном препарате сплит-вакцины и подтверждение наличия преимущественного содержания гемагглютинина и нейраминидазы в субъединичных моновакцинах.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Бесцветная или слегка желтоватая прозрачная жидкость, возможно наличие слабой опалесценции. Определение проводят визуально.

Подлинность. Каждый подтип и тип антигена должен нейтрализоваться гомологичной сывороткой. Титр с гетерологичной сывороткой должен быть ниже ее собственного титра, по крайней мере, в 4 раза. Определение проводят на стадиях получения полуфабрикатов: объединенного вирусного концентрата или моновакцины в реакции торможения гемагглютинации (РТГА).

Метод постановки РТГА с вирусом гриппа (макрометод). РТГА применяют для установления типа и подтипа вируса, т.е. специфичности, а также для определения нарастания титров специфических антител. Постановка РТГА включает следующие этапы: приготовление взвеси эритроцитов, определение гемагглютинирующего титра антигена в реакции гемагглютинации (РГА) и рабочей дозы вируса, постановка самой реакции. Для постановки реакции необходимы следующие ингредиенты:

- исследуемый антиген (вакцина, вируссодержащая жидкость – аллантоисная или культуральная);
- иммунные сыворотки к различным типам (А и В) и субтипам типа А вируса гриппа;
- фосфатный буферный раствор pH 7,2 ± 0,2 (ФБР);
- суспензия куриных эритроцитов, 1 %.

1. Приготовление взвеси куриных эритроцитов. Для постановки РТГА используют эритроциты петухов. Кровь у петухов берут из сердца или подкрыльцевой вены.

Свежеполученную кровь от 3 – 5 петухов помещают во флакон со стеклянными бусами или с одним из антикоагулянтов (раствор Альсевера,

Электронная библиотека

5 % раствор натрия цитрата). Дефибринирование крови проводят немедленно путем интенсивного встряхивания флакона в течение 5 – 7 мин при температуре (20 ± 2) °С до выпадения волокон фибрина.

Дефибринированную кровь фильтруют через 4 слоя марли, затем трехкратно отмывают ФБР путем центрифугирования при 1500 об/мин в течение 5 мин или 800±200 об/мин в течение (15±5) мин». Надосадочную жидкость удаляют. Из осадка, принимаемого за 100 %, готовят 1 % суспензию куриных эритроцитов по объему.

2. Определение гемагглютинирующего титра антигена. В лунках агглютинационнного планшета готовят двукратные разведения антигена в объеме 0,4 мл на фосфатном буферном растворе, начиная с 1:10 до 1:1280. В каждую лунку вносят по 0,4 мл 1 % суспензии эритроцитов. Содержимое лунок перемешивают встряхиванием планшета и оставляют при температуре (20 ± 2) °С на 40 – 45 мин (до оседания эритроцитов в контроле).

Реакцию оценивают по «четырехкрестовой» системе. За титр антигена, или одну агглютинирующую единицу (АЕ), принимают наибольшее разведение антигена, дающее четко выраженную агглютинацию эритроцитов (+++ или ++++).

Определение титра антигена сопровождается отрицательным контролем на отсутствие спонтанной агглютинации эритроцитов. С этой целью в контрольную лунку того же агглютинационнного планшета вносят 0,4 мл фосфатного буферного раствора и 0,4 мл 1 % суспензии эритроцитов. При отсутствии спонтанной агглютинации на дне лунки выпадает гомогенный с ровными краями осадок эритроцитов (отрицательная реакция).

3. Приготовление рабочей дозы антигена. В РТГА рабочей дозой антигена является то разведение антигена, в 0,2 мл которого содержится 4 агглютинирующие единицы (4 АЕ). Для вычисления ее следует установленную величину титра антигена разделить на 8. Полученная от

деления цифра указывает во сколько раз нужно развести антиген, чтобы в 0,2 мл его содержалось 4 АЕ (рабочая доза).

Перед постановкой основного опыта проверяют точность приготовления рабочей дозы (4 АЕ). Для этого в пять лунок горизонтального ряда плексигласового планшета, начиная со второй, вносят по 0,2 мл фосфатного буферного раствора. В 1-ю и 2-ю лунки добавляют по 0,2 мл приготовленной рабочей дозы антигена. После перемешивания переносят 0,2 мл смеси из лунки в лунку, начиная со 2-й по 5-ю лунку, из 5-й лунки 0,2 мл удаляют. Затем в каждую лунку добавляют по 0,2 мл фосфатного буферного раствора и по 0,4 мл 1 % суспензии куриных эритроцитов. В 6-й лунке ставят контроль на отсутствие спонтанной агглютинации эритроцитов. После встряхивания смесь оставляют при температуре (20 ± 5) °С на 40–45 мин (до оседания эритроцитов в контроле).

При правильном выборе рабочей дозы полная (++++) агглютинация эритроцитов должна наблюдаться только в первых трех лунках. В 4-й и 5-й лунках агглютинация должна отсутствовать. В случае отклонения от указанного выше, разведение антигена должно быть изменено путем добавления соответствующего количества антигена или фосфатного буферного раствора для получения необходимой рабочей дозы. При этом необходимо повторно проверить правильность приготовления рабочей дозы.

4. Постановка реакции торможения гемагглютинации. Для удаления неспецифических ингибиторов гемагглютинации перед постановкой РТГА сыворотки необходимо обработать нейраминидазой холерных вибрионов или RDE-реагентом (Примечания).

После удаления неспецифических ингибиторов готовят двукратные разведения сывороток в лунках плексигласовой доски, начиная с 1:10 до 1:640 и выше в объеме 0,2 мл. К каждому разведению сыворотки добавляют по 0,2 мл рабочей дозы антигена (4 АЕ). Смесь встряхивают и после контакта антигена и сыворотки (от 30 мин до 1 час) при температуре (20 ± 2) °С в

каждую лунку добавляют по 0,4 мл 1 % суспензии куриных эритроцитов. Смесь повторно встряхивают, оставляют при температуре (20 ± 2) °С в течение 40 – 45 мин (до оседания эритроцитов в контроле), после чего производят учет результатов реакции.

При наличии в сыворотке специфических антител наступает задержка агглютинации эритроцитов. За титр сыворотки принимают предельное разведение, вызывающее полную задержку гемагглютинации.

Задержка гемагглютинации указывает на соответствие типа антигена и взятой сыворотки; отсутствие задержки гемагглютинации свидетельствует о несоответствии типа взятой сыворотки антигену.

Примечания.

1. Удаление неспецифических ингибиторов гемагглютинации из иммунных сывороток с помощью нейраминидазы холерных вибрионов или RDE-реагентом. При наличии инструкции по применению коммерческого реактива необходимо следовать требованиям, изложенным в данном документе.

Метод основан на способности нейраминидазы холерных вибрионов, не действуя на специфические антитела, разрушать ингибиторы гемагглютинации к вирусам гриппа А и В в сыворотках крови человека, кур, крыс, кролика.

Добавить к 1 объему сыворотки 3 объема реагента нейраминидазы. К смеси, состоящей из 0,1 мл сыворотки и 0,3 мл реагента нейраминидазы, добавляют 0,6 мл фосфатного буферного раствора, чтобы получить разведение сыворотки 1:10. Смесь инкубируют при температуре (37 ± 2) °С в течение 18 – 20 час и затем прогревают при температуре (56 ± 2) °С в течение 30 мин.

Сыворотка, обработанная нейраминидазой, может быть использована для РТГА в течение 2 недель при условии ее хранения при температуре (5 ± 1) °С.

2. Приготовление 0,1 М раствора фосфатного буферного (pH 7,2 ± 0,2).

Раствор 1. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 17,8 г натрия фосфата двузамещенного 2 – водного ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$), растворяют в 500 мл воды очищенной, доводят объём раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Раствор 2. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 15,6 г натрия фосфата однозамещённого 2–водного ($NaH_2PO4 \cdot 2H_2O$), растворяют в

500 мл воды очищенной, доводят объём раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносят 720 мл раствора 1, прибавляют 280 мл раствора 2 и перемешивают. Затем в мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 100 мл приготовленного 0,1 М фосфатного буферного раствора доводят объём раствора водой очищенной до метки, перемешивают, прибавляют 8,5 г натрия хлорида и вновь перемешивают. pH полученного раствора должен быть 7,2 ± 0,02. Если показатель pH выше или ниже требуемого, его соответственно доводят 1 М раствором хлористоводородной кислоты или 1 М раствором натрия гидроксида.

Приготовление раствора Альсевера

Состав:

- 2,05 % глюкозы;
- 0,42 % натрия хлорида;
- 0,8 % натрия цитрата;
- 100,0 мл воды очищенной.

pH раствора доводят с помощью 5 % раствора лимонной кислоты до pH 5,6 (примерно 10 мл 5 % раствора лимонной кислоты на 1 л раствора Альсевера). Раствор стерилизуют фильтрацией или автоклавированием в течение 3 последовательных дней при температуре 100 °С и давлении 0,7 атм. Для консервирования добавляют на 1 мл крови 1,2 мл раствора Альсевера. В данном растворе эритроциты могут храниться при температуре (4 ± 2) °С в течение 1–2 нед. Перед использованием эритроциты необходимо трехкратно отмыть фосфатным буферным раствором с помощью центрифугирования при (800 ± 200) об/мин в течение 10 мин.

3. Приготовление консервирующего 5 % раствора натрия цитрата.

5 % раствор натрия цитрата перед использованием разводят в 2 раза 0,1 М фосфатным буферным раствором (pH 7,2 ± 0,2). К одной части полученного раствора натрия цитрата добавляют 2 части крови петухов. В данном растворе эритроциты могут храниться при температуре (4 ± 2) °С в течение 3 – 5 сут.

Метод постановки РТГА с вирусом гриппа (микрометод). Принцип метода, его учет и ингредиенты, те же, что и для проведения РТГА макрометодом. Отличие методов заключается в изменении концентрации и объемов ингредиентов.

Реакцию ставят в микропланшетах с «U»-образными лунками.

1. Приготовление 0,5 % взвеси куриных эритроцитов. Взвесь готовят из 1 % суспензии эритроцитов (см. макрометод) разведением ее в 2 раза фосфатным буферным раствором.

2. Определение гемагглютинирующего титра антигена. В каждую лунку микропланшета одного ряда вносят фосфатный буферный раствор в объеме 50 мкл. Затем в первую лунку вносят 50 мкл антигена в разведении 1:10 и далее проводят титрование по принципу двукратного разведения. Из последней лунки удаляют 50 мкл. Затем в каждую лунку вносят по 50 мкл 0,5 % суспензии эритроцитов. Содержимое лунок перемешивают встряхиванием и оставляют при комнатной температуре на 40–45 мин до оседания эритроцитов в контроле.

Реакцию оценивают по «четырехкрестовой» системе. За титр антигена, или одну агглютинирующую единицу (АЕ), принимают наибольшее разведение антигена, дающее четко выраженную агглютинацию эритроцитов (+++ или ++++).

Определение титра антигена сопровождается постановкой отрицательного контроля на отсутствие спонтанной агглютинации эритроцитов. В качестве отрицательного контроля служат несколько лунок панели, в которые вместо антигена внесен фосфатный буферный раствор.

3. Приготовление рабочей дозы антигена. Рабочая доза антигена при постановке РТГА микрометодом равна 8 АЕ. Для её расчета и последующего приготовления гемагглютинирующий титр делят на 16. Полученное значение указывает во сколько раз необходимо развести антиген.

Пример: титр антигена равен 160. Разделив 160 на 16, получаем цифру 10, указывающую на то, что антиген необходимо развести в 10 раз.

Перед постановкой основного опыта проверяют точность приготовления рабочей дозы (8 АЕ). Для этого в шесть лунок микропланшета, начиная со второй, вносят по 25 мкл фосфатного буферного раствора. В 1 и 2 лунки добавляют по 25 мкл приготовленной рабочей дозы антигена. После перемешивания 25 мкл смеси переносят из 2 лунки в 3, из 3 – в 4 и т.д. Из последней лунки панели 25 мкл удаляют. Затем во все лунки добавляют по 25 мкл фосфатного буферного раствора и по 50 мкл 0,5 %

суспензии эритроцитов. После встряхивания смесь оставляют при температуре (20 ± 5) °С на 40 – 45 мин до оседания эритроцитов в контроле.

При правильном выборе рабочей дозы агглютинация эритроцитов должна наблюдаться только в четырех лунках микропланшета. В остальных лунках агглютинация должна отсутствовать. В случае отклонения от указанного результата добавляют антиген или фосфатный буферный раствор для получения необходимой рабочей дозы.

4. Постановка реакции торможения гемагглютинации. Метод постановки реакции микрометодом соответствует таковому, описанному для макрометода, за исключением объемов используемых ингредиентов реакции.

Готовят двукратные разведения сыворотки в объеме 25 мкл, вносят рабочую дозу антигена (8 АЕ) в объеме 25 мкл и после контакта антигена и сыворотки (от 30 мин до 1 ч) при температуре (20 ± 2) °С в каждую лунку панели вносят по 50 мкл 0,5 % взвеси эритроцитов. После оседания эритроцитов в контроле (как правило, через 40 – 45 мин) проводят учет результатов (макрометод).

За титр сыворотки принимают величину обратную ее разведению, при котором отсутствует агглютинация эритроцитов.

Прозрачность. Должна выдерживать сравнение с эталоном II. Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Цветность. Интенсивность окраски раствора не должна быть более эталона Y_5. Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH. От 7,0 до 7,6. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Герметизация Ампулы и флаконы должны быть герметичны. Определение проводят в соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Белок. Не более 100 мкг на дозу для цельновирионных и расщепленных вакцин для каждого из входящих в состав вакцины штамма. Не более 40 мкг на дозу для субъединичных вакцин за вычетом количественного содержания гемагглютинина для каждого из входящих в состав вакцины штамма. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение белка» по методу Лоури, если нет других указаний в нормативной документации.

Стерильность. Должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Бактериальные эндотоксины. Не более 100 ЕЭ/доза. Определение проводят методом гель-тромб теста в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины». Чувствительность используемого ЛАЛ-реактива должна быть указана в нормативной документации.

Пирогенность. Должен быть апирогенным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Тест-доза - 0,1 мл вакцины на кг массы кролика. В нормативной документации могут быть указаны иные тест-дозы. Проведение теста не требуется при определении бактериальных эндотоксинов (методы являются взаимозаменимыми).

Аномальная токсичность. Должен быть нетоксичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Доза для мышей и морских свинок 0,5 мл внутрибрюшинно. В нормативной документации могут быть указаны иные тест-дозы.

Специфическая безопасность. Не должен содержать живого вируса гриппа.

Определение отсутствия живого вируса проводят путем заражения 10 куриных эмбрионов (10–12-дневных) по 0,2 мл препарата в аллантоисную полость. Через 48 час – для вируса гриппа типа А и через 72 час – для вируса гриппа типа В инкубации эмбрионов в термостате при температуре 35 – 37 °С аллантоисную жидкость проверяют на наличие гемагглютинина с эритроцитами петухов (1 % суспензия). Не менее 7 из 10 куриных эмбрионов должны остаться живыми. Собирают по 0,5 мл аллантоисной жидкости из каждого эмбриона, объединяя жидкость от всех групп. Затем заражают по 0,2 мл неразведенной смеси аллантоисной жидкости 10 эмбрионов. Эмбрионы инкубируют при тех же условиях, после чего определяют наличие гемагглютининов аллантоисной жидкости после второго пассажа. Результаты реакции после 2-го пассажа должны быть отрицательными. В том случае, если определяется наличие гемагглютининов в аллантоисной жидкости после 2-го пассажа, допускается проведение 3-го пассажа. Результаты реакции после 3-го пассажа должны быть отрицательными.

Специфическая активность. Должен содержать гемагглютинин вируса гриппа подтипов типа А и типа В не более 15 ± 2 мкг на дозу. Требование к количественному содержанию гемагглютинина в дозе формулируют на основании результатов клинических испытаний по иммуногенности. Специфическую активность определяют в реакции одиночной радиальной иммунодиффузии (ОРИД).

Принцип метода. Гемагглютинин (ГА), диффундируя из лунок агарозного геля в радиальном направлении, реагирует со специфическими антителами сыворотки, находящейся в агарозе, и образует в геле зону преципитации. Размеры окружающей лунку зоны преципитации находятся в прямой зависимости от количества антигена, внесенного в лунку.

1. Ингредиенты для проведения ОРИД:

– стандарт моноспецифической сыворотки к гемагглютинину вируса гриппа;
– стандартный антиген (гемагглютинин) вируса гриппа;
– агароза;
– детергент;
– краситель – кислотный синий 83 (Кумасси бриллиантовый синий Р250);
– раствор для обесцвечивания агарозных гелей;
– фосфатный буферный раствор (ФБР): 0,01 М фосфатный буферный раствор pH 7,2, содержащий 0,15 М раствор натрия хлорида и 0,01 % раствор натрия азида. Вместо ФБР можно использовать 0,01 М буферный раствор трис(гидроксиметил)аминометана с хлористоводородной кислотой pH 7,2–7,3, содержащий 0,15 М раствор натрия хлорида и 0,01 % раствор натрия азида;
– 1–10 % растворы натрия азида.

2. Приготовление стандартных образцов реагентов для выполнения ОРИД.

2.1. Приготовление стандарта моноспецифической сыворотки к гемагглютинину вируса гриппа

Иммунизируют кролика или барана гемагглютинином, который должен содержать белок (не менее 100 мкг/мл), электрофоретически гомогенный при электрофорезе в полиакриламидном геле. Моноспецифические сыворотки получают иммунизацией животных очищенным белком гемагглютинина с равным объемом адъюванта Фрейнда. Первая иммунизация по 0,5 мл смеси в две точки, вторая и третья иммунизация – через 2 недели в том же объеме в две точки внутримышечно и по 0,1 мл гемагглютинина без адъюванта в четыре точки внутрикожно. Обескровливание животных проводится через 2 недели. Предварительно проводится отбор пробной партии крови. При необходимости проводят дополнительно введение антигена. Титр сыворотки в РТГА должен быть не ниже 1:5000.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Полученную сыворотку прогревают при температуре 56 °С, разводят ФБР в 2-4 раза в зависимости от ее активности (в соответствии с паспортом на сыворотку), разливают по 0,5 мл в ампулы и высушивают.

В ОРИД может быть использован международный стандарт моноспецифической сыворотки к гемагглютинину вируса гриппа производства NIBSC (Великобритания) или TGA (Австралия).

2.2. Приготовление стандартного антигена (ГА) вируса гриппа. Стандарт гемагглютинина (антиген) для ОРИД должен содержать 20–50 мкг ГА в 1 мл и не ниже 1:32000 АЕ.

Используют полуфабрикат инактивированной гриппозной вакцины с содержанием белка 25 – 400 мкг/мл. Соотношение экстинкции полуфабриката A_{260}/A_{280} должно быть 1,1 – 1,18. Содержание сахарозы – 5 – 7 % (в случае отсутствия сахарозы подбирают наполнитель для сушки). Жидкий препарат разливают по 1,0 мл в ампулы и подвергают лиофильной сушке (условия лифильного высушивания препарата указывают в нормативной документации).

В ОРИД может быть использован международный стандарт гемагглютинина вируса гриппа производства NIBSC или TGA.

3. Оборудование:

– стеклянные пластины 6×9 см;
– автоматические дозаторы регулируемые на 0-20 мкл, а также автоматические дозаторы объемом 100–1000 мкл;
– водяная баня (температура до 100 °С);
– прибор для измерения диаметра колец преципитации;
– горизонтальный предметный столик с уровнем;
– камера (влажная) для инкубации;
– пробойник из нержавеющей стали с внешним диаметром 3 или 4 мм.

4. Проведение ОРИД. Для реакции используют стеклянные пластины размером 6 × 9 см. Для этого пластины кипятят в воде с добавлением моющих средств, затем промывают водой, помещают на сутки в 1 М раствор

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

натрия гидроксида и затем на сутки в смесь Никифорова, содержащую спирт этиловый и эфир наркозный в соотношении 1:1. Обезжиренные пластины промывают водой и высушивают.

Перед нанесением агарозы пластину равномерно протирают марлей, смоченной расплавленной горячей агарозой. Приготовленные заранее порции агарозы объемом по 12 мл расплавляют в кипящей водяной бане при температуре 100 °С, затем охлаждают до температуры 56 °С в водяной бане в течение не менее 30 мин. При температуре 56 °С к агарозе добавляют предварительно подогретую моноспецифическую сыворотку в объеме, указанном в инструкции к стандарту. Агарозу с сывороткой тщательно перемешивают, не допуская образования пузырьков воздуха, и быстро и равномерно наносят на пластины, помещенные на ровную горизонтальную поверхность предметного столика с «уровнем», и оставляют на 30 мин при комнатной температуре. Приготовленные пластины с сывороткой можно хранить во влажной камере при температуре 4 - 8 °С в течение 6 – 7 сут.

В застывшей агарозе пробойником из нержавеющей стали с внешним диаметром 4 мм делают 6 рядов лунок по 4 лунки в каждом на расстоянии не менее 1,5 см от края пластины. Расстояние между лунками должно быть не менее 1 см. Агарозу из прорезанных лунок удаляют под легким вакуумом.

Определение специфической активности вакцин, т.е. определение содержания антигена, гемагглютинина (ГА) в мкг/мл, проводят на двух пластинах. На каждой пластине исследуют стандарт и серии вакцины, отводя под каждый образец по два ряда лунок. На второй пластине проверяют те же образцы, но расположение вакцин и стандарта произвольно меняют. Предварительно готовят 500 мкл смеси детергента и антигенов, состоящей из (50 мкл детергента и 450 мкл антигена) и далее, смесь инкубируют при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем готовят разведения антигенов: неразведенный антиген, 0,75, 0,5 и 0,25 мкл (или в соотношении: 1:0, 3:1, 1:1, 1:3), используя для разбавления ФБР (табл.).

Таблица – Схема разведений антигена

Разведение	Соотношение	Объем в мкл	
		Антиген	Растворитель
неразвед.	1:0	100	0
0,75	3:1	150	50
0,5	1:1	100	100
0,25	1:3	100	300

Вакцина и стандартный антиген должны содержать близкие количества ГА, так, чтобы размеры зон преципитации могли быть сравнимы. Поэтому, если вакцина, согласно паспортным данным, содержит меньше ГА, чем стандарт, необходимо провести предварительное разведение стандарта и, наоборот: в случае, если стандарт менее активен, чем вакцина, то делают разведение разводится вакцинаы. В документации на стандарт должны быть указаны рекомендуемые разведения стандарта и сыворотки.

В лунки вносят по 10 или по 20 мкл каждого разведения, начиная с разведения 1:3, с помощью автоматического дозатора со сменой наконечников при переходе от одного разведения к другому. Через 30 мин пластины помещают во влажную камеру на 18 – 24 час при комнатной температуре. Затем для удаления из геля неспецифических белков пластины помещают в ФБР на несколько часов. При этом меняют ФБР 2 – 3раза. Далее пластинки с гелем покрывают смоченной в ФБР плотной фильтровальной бумагой, избегая образования воздушных пузырьков на поверхности геля, затем несколькими слоями сухой фильтровальной бумаги и помещают под груз (не более 10 г на 1 см² поверхности). Бумагу, за исключением первого слоя, меняют через каждые 10 – 15 мин до тех пор, пока она не перестанет впитывать влагу из агарозы. Для дальнейшего высушивания пластины помещают под вентилятор, не снимая первого слоя бумаги. Пластинки высушивают до момента, когда фильтровальная бумага первого слоя будет

свободно отделяться от агарозы, затем заливают красителем и окрашивают не менее 30 мин. После окрашивания пластины обесцвечивают в растворе для обесцвечивания гелей до проявления четких колец преципитации на слабо окрашенном фоне. После подсушивания кольца преципитации измеряют в двух взаимно перпендикулярных направлениях.

5. Результаты анализа. Рассчитывают квадраты диаметров колец преципитации каждого антигена на основании средних величин по двум пластинам и строят график, откладывая по оси ординат квадраты диаметров, а по оси абсцисс – разведения антигенов. На графике зависимость квадрата диаметров от разведений для каждой вакцины должна быть выражена прямой линией, которая должна располагаться по оси ординат в пределах 3 мм² от стандартной кривой. Если расстояние между начальными точками тестируемого и стандартного антигена превышает 3 мм², такие результаты не учитывают; в этом случае необходимо более точно подобрать концентрации антисыворотки и антигенов. Затем на оси ординат между начальными точками кривой стандарта и каждого антигена находят среднюю точку, от нее проводят прямую, параллельную оси абсцисс, а от нее на уровне разведения 1:3 находят расстояния до кривой тестируемого антигена и стандартного. Количество ГА (Х) в вакцине в мкг/мл рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{L_X}{L_{CT}} \cdot a \cdot b,$$

где: L_x, $L_{ст}$ – расстояния по перпендикуляру на уровне разведения 1:0 от срединной линии до пересечения с кривыми тестируемого и стандартного антигенов, соответственно;

a – содержание ГА в мкг/мл в стандарте;

b – предварительное разведение вакцины.

Учет результатов ОРИД можно проводить, используя программное обеспечение. Методика должна быть валидирована.

Примечания.

1. Приготовление моноспецифической сыворотки к ГА. Делают разведение водой очищенной до объема, указанного на ампуле; последующие разведения делают с помощью ФБР.

2. Приготовление стандартного антигена. Делают разведение водой в объеме, указанном на ампуле; дальнейшие разведения делают с помощью ФБР. Разведенный антиген хранят при температуре 4 °С не более 6 час.

3. Приготовление агарозы. Агарозу заливают ФБР (конечная концентрация 1,5 %) и нагревают в кипящей водяной бане до полного растворения. Расплавленную агарозу фильтруют в горячем виде через ватно-марлевый фильтр, разливают по 12 мл в пробирки и закрывают резиновыми пробками. В таком виде агароза может храниться более 3 мес. при комнатной температуре (если агароза начинает отделяться от стенок пробирки, ее не используют).

4. Детергенты. Используют детергенты, указанные в паспорте (инструкции) к стандарту. Растворы детергентов готовят на воде очищенной и хранят при комнатной температуре в течение 6 мес.

5. Краситель. Готовят 0,3 % раствор кислотного синего 83 (Кумасси бриллиантовый синий Р250) в растворе для обесцвечивания гелей. Краситель хранят при комнатной температуре и может использоваться до выпадения в осадок образовавшихся кристаллов красителя.

6. Раствор для обесцвечивания окрашенных агарозных гелей. В мерный цилиндр вместимостью 1 л вносят 200 мл уксусной кислоты ледяной, добавляют 500 мл этилового спирта, перемешивают, доводят объем раствора до метки и вновь перемешивают. Раствор хранят неограниченное время в емкости с притертой пробкой.

Вещества, вносимые в препарат. Выполняются тесты определения содержания соответствующих химических и вспомогательных веществ, указанных в нормативной документации, используемых для разрушения вируса и его инактивации.

Все исходные материалы и сырье, используемые при производстве, должны иметь сертификаты соответствия (допустимо только фармакопейное качество используемых компонентов). В состав вакцины должны входить вспомогательные компоненты, разрешенные к медицинскому применению и в дозах не вызывающих токсические, аллергические или иные нежелательные реакции у человека.

Тиомерсал. От 42,5 до 57,5 мкг на дозу. Определение проводят колориметрическим или методом атомно-абсорбционной спектрометрии в

соответствии с ОФС «Количественное определение тиомерсала в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Овальбумин. Не более 1 мкг на дозу. Определение проводят иммуноферментным методом анализа с тест–системой для количественного определения овальбумина в жидкости. Чувствительность используемой тест-системы и условия проведения анализа указывают в нормативной документации.

Иммуногенность. Контролируют три первые серии вакцины, содержащие новый вакцинный штамм, по данным исследования в РГГА парных сывороток добровольцев, полученных до иммунизации и после нее по методу, описанному в разделе «Подлинность».

Для оценки иммуногенности должны быть взяты парные сыворотки (до вакцинации и через 21-28 дней после вакцинации). Обе сыворотки титруют одновременно в РТГА с эритроцитами петуха (раздел «Подлинность»). Титр в РТГА менее 1:10 оценивается как 1:5.

Показатели иммуногенности для серонегативных (с исходным титром не более 1:20):

– Число лиц с четырехкратным и более увеличением титра антител (сероконверсия) должно быть > 40 %;
– Увеличение среднегеометрического титра (кратность нарастания) > 2,5 раза;
– Процент лиц с защитным титром антителом ≥ 40 должно быть > 70 %.

По крайней мере, один показатель должен отвечать вышеуказанным требованиям.

Каждую серию вакцины испытывают на группе из 30 человек в возрасте от 18 лет. Ввиду малочисленности групп лиц вакцинированных каждой серией вакцины при замене штамма в учет результатов могут быть включены серопозитивные лица (с титром антител ≥ 40).

Реактогенность. Вакцина должна быть ареактогенной или слабо реактогенной. Контролируют три первые серии вакцины, содержащей новый

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

вакцинный штамм. Каждую серию вакцины испытывают на той же группе людей численностью 30 человек в возрасте от 18 лет, на которой определяют иммуногенность.

У части привитых могут наблюдаться местные и общие реакции различной степени выраженности; гиперемия, болезненность, припухлость в месте введения; недомогание, головная боль, повышение температуры. Местные реакции должны исчезать в течение от 1 до 3 суток (очень редко – до 5 суток), общие – в течение 3 суток. Допустимые реакции и их количество определяют для каждого конкретного препарата по результатам клинических исследований.

Производственные штаммы. Штаммы вирусов гриппа типа А и В для производства вакцин должны быть рекомендованы ВОЗ, ЕС и национальной Комиссией по гриппозным вакцинным и диагностическим штаммам. Должны соответствовать по антигенной структуре антигенной разновидности вирусов гриппа подтипов $A(H_1N_1)$ и $A(H_3N_2)$ и типа В на текущий эпидемический сезон, с известной историей пассажей и источника выделения.

Штаммы должны отвечать следующим требованиям:

- быть адаптированными к куриным эмбрионам и не требовать дополнительной аттенуации;

- быть стерильными: не содержать посторонних вирусов, микоплазм и микобактерий туберкулеза;

- быть специфичными в РТГА и РИНА (реакция ингибирования нейраминидазной активности) со штаммоспецифическими противогриппозными сыворотками;

- быть нетоксичными для белых мышей;

- иметь в лиофилизированном виде инфекционную активность на куриных эмбрионах не ниже 10^6 $ЭИД_{50}$/0,1 мл;

- должны вызывать накопление гемагглютининов в аллантоисной жидкости зараженных куриных эмбрионов в титре не ниже 1:256.

Производственные штаммы должны контролироваться не реже 1 раза в год.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты». Вторичная (потребительская) упаковка кроме общепринятых требований, должна содержать сведения о субстрате культивирования, составе штаммов, эпидсезоне, для которого предназначен препарат, количестве гемагглютинина каждого штамма в дозе, наличие или отсутствие консерванта либо его остаточное количество.

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С в сухом месте. Замораживание не допускается.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Вакцина для профилактики гепатита А культуральная очищенная концентрированная адсорбированная инактивированная жидкая

ФС.3.3.1.0029.15

Взамен ВФС 42-2743-96

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину для профилактики гепатита А культуральную, очищенную концентрированную адсорбированную инактивированную жидкую, предназначенную для профилактики гепатита А, которая представляет собой суспензию инактивированных вирионов вируса гепатита А (ВГА), выращенных на разрешенной для производства вакцин культуре перевиваемых клеток, очищенных, концентрированных и адсорбированных на геле алюминия гидроксида.

Готовую форму вакцины выпускают в жидком виде в ампулах для внутримышечного введения.

Препарат предназначен для профилактики вирусного гепатита А у взрослых (доза 1 мл) и детей (доза 0,5 мл).

ПРОИЗВОДСТВО

Для производства вакцины против гепатита А используют штамм вируса гепатита А (ВГА), адаптированный к перевиваемой культуре клеток. Производственный штамм вируса является исходным для приготовления посевного вируса. Его хранят в ампулах при температуре минус (20 ± 2) °С с ежегодной проверкой инфекционного титра и антигенной активности.

Производственный штамм должен быть депонирован.

Федеральная электронная медицинская библиотека

Производственный штамм контролируется не реже 1 раза в год.

Посевной вирус получают путем заражения производственным штаммом перевиваемой культуры клеток. Посевным вирусом может служить сбор 1-го и 2-го пассажа производственного штамма в указанной выше культуре. Сбор вируса осуществляют на 21 сут инкубации зараженной культуры клеток при температуре (37 ± 2) °С. Зараженные клетки собирают в 0,01 М фосфатно-солевом буферном растворе, pH (7,6 ± 0,2), пятикратно замораживают при температуре минус (20 ± 2) °С, оттаивают при температуре (18 ± 2) °С.

Посевной вирус должен быть свободным от контаминации бактериями (в том числе микоплазмами), грибами и посторонними вирусами; должен обладать антигенной специфичностью и репродуктивной активностью. Инфекционный титр вируса должен быть не ниже $10^{5,5}$ $ТЦД_{50}$/мл при заражении перевиваемой культуры клеток. Посевной вирус хранят при температуре не выше минус (20 ± 2) ^{0}С с ежегодным контролем его инфекционного титра.

Состав на 1 мл (1 прививочная доза для взрослых), если нет других указаний в нормативной документации:

- инактивированный антиген вируса гепатита А – не менее 320 ИФА единиц;
- алюминия гидроксид – от 0,35 до 0,65 мг;
- формальдегид – не более 0,15 мг;
- 0,01 М фосфатно-солевой буферный раствор – до 1 мл.

Вакцина не содержит консервантов и антибиотиков.

Состав на 0,5 мл (1 прививочная доза для детей), если нет других указаний в нормативной документации:

- инактивированный антиген вируса гепатита А – не менее 160 ИФА единиц;
- алюминия гидроксид – от 0,17 до 0,32 мг;

- формальдегид – не более 0,07 мг;
- 0,01 М фосфатно-солевой буферный раствор – до 0,5 мл.

Вакцина не содержит консервантов и антибиотиков.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Слегка опалесцирующая суспензия, при отстаивании разделяющаяся на 2 слоя: верхний – прозрачная, бесцветная жидкость; нижний – осадок белого цвета, легко разбивающийся при встряхивании, без образования хлопьев и посторонних включений.

Подлинность. Препарат должен быть идентичным антигену вируса гепатита А и должен индуцировать у мышей образование антител к вирусу гепатита А (ВГА), наличие которых определяют в соответствии с ОФС «Метод иммуноферментного анализа» с помощью коммерческих тест-систем для выявления антител к вирусу гепатита А.

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Размер частиц. Суспензия должна свободно проходить в шприц через иглу № 0840. Определение проводят визуально в соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

Время седиментационной устойчивости. Суспензия, образующаяся при встряхивании, не должна расслаиваться в течение не менее 5 мин. Определение проводят визуально в соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

pH. От 7,0 до 7,6. Испытания проводятся потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Стерильность. Препарат должен быть стерилен. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность. Препарат должен быть апирогенным. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность».

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичным. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

Специфическая активность. Испытания проводят путем определения содержания вирусного антигена гепатита А методом иммуноферментного анализа (ИФА) или по иммуногенной активности вакцины биологическим методом.

Определение содержания вирусного антигена гепатита А (АГ ВГА) Содержание вирусного антигена должно быть не менее 320 ИФА единиц в 1 дозе вакцины для взрослых и не менее 160 ИФА единиц в 1 дозе вакцины для детей; определение проводят методом ИФА с использованием коммерческих тест-систем для выявления антигена ВГА. Определение содержания антигена ВГА в вакцине проводят параллельно с определением содержания антигена в стандартном образце (СО) вакцины. Отношение содержания АГ ВГА в 1 дозе вакцины к содержанию АГ ВГА в СО должно находиться в пределах от 0,66 до 1,66 при статистической обработке результатов методом параллельных линий. Постановку контроля осуществляют в соответствии с инструкцией по применению используемой тест-системы.

Перед постановкой ИФА проводят предварительную десорбцию АГ ВГА с алюминием гидроксида, центрифугируя 1000 мкл испытуемого образца вакцины и СО при 6000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре.

Из 900 мкл надосадочной жидкости готовят ряд последовательных двукратных разведений от 1:2 до 1:4 и осуществляют постановку ИФА с определением титра АГ ВГА в надосадочной жидкости (расчет N_1).

Осадок растворяют в 900 мкл буферного раствора для десорбции, тщательно перемешивают и оставляют на ночь при температуре от 2 до 8 °С. Затем центрифугируют при 6000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре. Из надосадочной жидкости готовят ряд последовательных двукратных разведений от 1:2 до 1:64 и определяют титр АГ ВГА методом ИФА (расчет N_2).

Расчет N_1 и N_2 осуществляют по формуле:

$$N=(T\cdot V_1)\ V_2,$$

где N – расчетное количество ИФА единиц в 1 мл готовой формы вакцины;

T – обратная величина титра антигена ВГА в ИФА;

V_1 – объем 1 дозы вакцины, мкл;

V_2 – объем исследуемого образца в ИФА, мкл.

Суммарное содержание антигена ВГА в вакцине (N_1 и N_2) должно быть не менее 320 ИФА единиц в 1 дозе вакцины для взрослых и не менее 160 ИФА единиц в 1 дозе вакцины для детей.

Примечание.

Приготовление буферного раствора для десорбции. В градуированную посуду вместимостью 50 мл помещают 50 мг желатина, 7,16 г натрия фосфорнокислого двузамещенного, 55 мг трилона Б (ЭДТА), 50 мкл твина-20 и растворяют в 40 мл воды очищенной, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре не более 1 мес.

Определение иммуногенной активности ВГА

Вакцина должна индуцировать образование антител к вирусу гепатита А у однократно иммунизированных белых нелинейных мышей (самцов) массой 18 – 20 г. Определение содержания антител к ВГА в сыворотке крови мышей проводят методом ИФА с определением $ИД_{50}$, которая должна составлять не менее 6. В качестве образца сравнения используют СО вакцины. Отношение $ИД_{50}$ в испытуемой вакцине к $ИД_{50}$ в СО должно находиться в пределах от 0,33 до 3 (P = 0,95) при статистической обработке результатов методом параллельных линий.

Метод основан на определении дозы вакцины, способной вызвать образование антител к вирусу гепатита А у 50 % мышей.

Для проведения теста готовят серию разведений испытуемого образца и СО вакцины от 1:2 до 1:32. Для разведения используют плацебо, в состав которого входит 0,01 М фосфатно-солевой буферный раствор (pH 7,0 –7,6) и

гель алюминия гидроксида в концентрации от 0,35 до 0,65 мг/мл (по Al^{+3}). Методом случайной выборки формируют опытные и контрольную группы по 10 мышей в каждой. Дополнительно 10 мышей оставляют интактными. Количество опытных групп должно соответствовать количеству используемых разведений.

Мышам опытных групп вводят разведения вакцины в объеме 1 мл подкожно в 2 точки, используя 1 разведение препарата на 1 опытную группу. Мышам контрольной группы по той же схеме и тем же способом вводят плацебо.

Через 28 – 30 дней животных обескровливают и готовят сыворотку. Каждый полученный образец сыворотки тестируют на наличие антител к вирусу гепатита А, используя коммерческие иммуноферментные тест-системы для выявления антител к вирусу гепатита А. Постановку и учет результатов осуществляют в соответствии с инструкцией по применению тест-системы.

Результаты контроля учитывают, если все образцы сывороток интактных и контрольной групп мышей идентифицированы как отрицательные. В этом случае расчет $ИД_{50}$ осуществляют по результатам, полученным в опытных группах, по методу Кербера в соответствии с формулой:

$$\lg ИД_{50} = \lg D_N - \delta\,(\Sigma\,Li - 0{,}5),$$

где D_N – максимальная величина вводимой дозы;

$\lg D_N$ – десятичный логарифм отношения каждой последующей дозы к предыдущей (десятичный логарифм кратности испытанных разведений);

Li – отношение числа иммунных животных к числу всех вакцинированных животных конкретными разведениями;

$\Sigma\,Li$ – сумма всех значений L.

$$ИД_{50} = \text{antilg}\,(-\lg ИД_{50}),$$

ФЭМБ Федеральный электронный медицинский библиотека

где $ИД_{50}$ – разведение вакцины, вызывающее выработку антител у 50 % животных.

Полнота сорбции антигена. Количество несвязанного антигена ВГА в вакцине должно быть не более 6 % от общего количества антигена ВГА. Образец вакцины (1000 мкл) и СО центрифугируют при 6000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре. Содержание несвязанного антигена определяют в надосадочной жидкости методом ИФА с использованием коммерческих тест-систем для определения антигена ВГА в соответствии с инструкцией по применению и выражают в процентах от общего количества антигена ВГА.

Формальдегид. Не более 0,15 мг/мл. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение формальдегида в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Алюминия гидроксид. От 0,35 до 0,65 мг/мл (в пересчёте на Al^{+3}). Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение ионов алюминия в сорбированных иммунобиологических лекарственных препаратах».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Дополнительная информация: указывается состав на 1 мл (1 прививочная доза для взрослых).

Наносятся предупредительные надписи: «Перед употреблением встряхивать», «Хранить в не доступном для детей месте», «Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений», «Не замораживать».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С. Не замораживать.

Федеральный электронный медицинский библиотека

Вакцина жёлтой лихорадки живая сухая, лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения **ФС.3.3.1.0030.15**

Взамен ФС 42-3686-98

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Вакцину жёлтой лихорадки живую сухую (лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения), представляющую собой лиофилизированную очищенную центрифугированием тонкоизмельченную ткань куриных эмбрионов, свободных от специфической патогенной микрофлоры (specific pathogen free – SPF), зараженных аттенуированным штаммом 17Д вируса желтой лихорадки.

Вакцина предназначена для профилактики желтой лихорадки.

Вакцина не содержит консервантов и антибиотиков.

ПРОИЗВОДСТВО

Для приготовления вакцины применяется культивирование вируса в куриных эмбрионах, свободных от специфической патогенной микрофлоры (SPF). Куриные эмбрионы должны быть получены из сертифицированных хозяйств.

Производство вакцины желтой лихорадки должно быть организовано при соблюдении условий установленных требований организации производства и контроля качества лекарственного препарата, гарантирующих качество и безопасность для человека. В соответствии с требованиями ВОЗ, должна строго выполняться система посевных серий, должно соблюдаться строгое ограничение количества пассажей вируса в

процессе приготовления вакцины (не более 2 пассажей от основного посевного вируса).

Для получения готовой лекарственной формы вакцины перед лиофилизацией в препарат добавляют (содержание расчётное) вспомогательные вещества, повышающие стабильность вакцины (стабилизаторы) при хранении и транспортировании в течение срока годности. Вспомогательные вещества поступают на производство с сертификатами качества и контролируются в соответствии с требованиями, предъявляемыми к ним нормативной документацией. Наименование и количество вспомогательных веществ (стабилизаторов) указывают в нормативной документации.

В состав препарата не должны вноситься в качестве стабилизатора альбумин человека или сыворотка крови человека.

Состав. Одна доза вакцины содержит: активный компонент – вирус желтой лихорадки, штамм 17Д - 1000LD_{50} или 1600 БОЕ вируса, может содержать вспомогательные вещества (содержание расчетное) предусмотренные нормативной документацией.

Производственный штамм. Аттенуированный штамм 17Д вируса желтой лихорадки.

Первичная посевная серия № 213/77 в лиофилизированной форме предоставляется референс-лабораторией ВОЗ. Условия хранения при температуре минус 70 ^{0}С.

Вторичную посевную серию (рабочий посевной вирус) готовят из первичной посевной серии, которая представляет собой лиофилизированную суспензию тонкоизмельчённой ткани куриных эмбрионов, свободных от специфической патогенной микрофлоры. Вторичную посевную серию производственного штамма получают в условиях одного производственного цикла, т.е. однократного пассирования первичной посевной серии вируса.

Вторичная посевная серия штамма 17Д применяется непосредственно для получения вакцины, должна быть аттестована и соответствовать следующим требованиям:

– быть стерильной (не содержать бактерий, грибов, микоплазм, микобактерий туберкулеза и посторонних вирусных агентов);
– обладать специфической активностью, определяемой в одной из культур клеток: первично-трипсинизированных фибробластах эмбрионов кур (ФЭК), или перевиваемых линиях клеток – клетки почек эмбриона свиньи (PS), или клетки почек зеленой мартышки *(Vero)*; или на лабораторных животных мышах линии Balb/c или СВА 4–6 недельного возраста, массой 10–12 г;
– титр вируса должен быть не менее 10000 LD50/мл при испытании на мышах или 16000 БОЕ/мл при испытании в культуре клеток;
– должна быть подлинной, т.е. нейтрализоваться специфической иммунной сывороткой к вирулентному штамму «Дакар» вируса желтой лихорадки с индексом нейтрализации не менее 1,0 lg;
– должна быть специфически безопасной при заражении обезьян *Macaca mulatta* (макака резус) или *Macaca fascicularis* (макака циномольгус) или другого вида обезьян чувствительного к вирусу желтой лихорадки. Обезьяны не должны иметь в крови вируснейтрализующих антител к вирусу желтой лихорадки до введения посевного вируса.

Нейротропные, висцеротропные и иммуногенные свойства вторичного посевного вируса контролируют на группе не менее чем 10 обезьян. Параллельно на таком же количестве обезьян проводят испытания первичной посевной серии вируса, которая в данном случае используется в качестве препарата сравнения.

Испытуемая доза, содержащая не менее, чем 5000 LD_{50} (8000 БОЕ) и не более, чем 50000 LD_{50} (80000 БОЕ), вводится во фронтальную долю мозга

каждой обезьяне под анестезией. Обезьяны после заражения должны наблюдаться в течение 30 сут.

Нейровирулентность вторичной посевной серии вируса считается удовлетворительной при отсутствии статистически достоверных отличий в гистологической оценке изменений, вызванных у обезьян после введения в мозг вторичной посевной серии вируса, по сравнению с аналогичными показателями изменений вызванных первичной посевной серией вируса.

Вторичная посевная серия вируса штамма 17Д должна быть висцеротропной (вызывать вирусемию). Выявление вируса проводят в сыворотках обезьян на 2, 4 и 6 сут после заражения по методике, применяемой для теста «Специфическая активность».

Содержание вируса в 0,03 мл сыворотки обезьяны должно быть не менее 100 LD_{50} (160 БОЕ) и не более 500 LD_{50} (800 БОЕ).

Вторичная посевная серия вируса штамм 17Д должна быть иммуногенна для обезьян, т.е. вызывать образование вируснейтрализующих антител к штамму 17Д вируса желтой лихорадки не менее, чем у 90% обезьян в течение 30 сут после введения испытуемой дозы. Наличие вируснейтрализующих антител в сыворотках крови подопытных обезьян устанавливают в реакции нейтрализации вируса желтой лихорадки в культурах клеток.

Вторичная посевная серия должна быть не токсичной для мышей и морских свинок (раздел «Аномальная токсичность»).

При параллельном испытании препарата сравнения – первичной посевной серии должны быть получены аналогичные результаты.

При изготовлении новых вторичных посевных серий (рабочий посевной вирус) необходимо подтверждение генетической стабильности методом сиквенирования.

Производственный штамм – вторичный посевной вирус должен храниться в лиофилизированном виде при температуре минус 70 ^{0}C.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Пористая масса светло-розового цвета, гигроскопична. Испытание проводят визуально.

Восстановленный препарат – опалесцирующая жидкость желтовато – розового цвета.

Подлинность. Аттенуированный вирус жёлтой лихорадки, штамм 17Д, содержащийся в вакцине, должен нейтрализоваться специфической иммунной сывороткой к штамму «Дакар» вируса жёлтой лихорадки. Индекс нейтрализации не менее 1,0 lg.

Определение проводят биологическим методом в реакции нейтрализации в одной из культур клеток: первично-трипсинизированные фибробласты эмбрионов кур (ФЭК); перевиваемой культуре клеток почек эмбрионов свиньи (PS); перевиваемой культуре клеток почек зеленой мартышки (*Vero*) или в реакции биологической нейтрализации на мышах линий Balb/c или СВА 4–6 недельного возраста массой 10–12 г (если в нормативной документации нет иных указаний).

Постановка реакции нейтрализации в культурах клеток

Приготовление смеси вируса вакцины и специфической иммунной сыворотки. Используют 2 ампулы вакцины. Содержимое ампул разводят в растворителе – вода для инъекций, содержащем 2 % сыворотки крови плодов коровы, жидкой, инактивированной при температуре 56 ±1°С в течение 30 мин (для исключения возможности присутствия ингибиторов вируса желтой лихорадки). Используют 0,5 мл растворителя на одну дозу вакцины. Восстановленную вакцину выдерживают при температуре от 18 до 25 °С в течение 15 – 20 мин. Затем содержимое двух ампул объединяют и готовят последовательные разведения вакцины 1:5 и 1:50 в растворе натрия хлорида 0,9 %, содержащем 2 % сыворотки крови плодов коровы, жидкой, инактивированной при температуре 56 ±1°С в течение 30 мин. Каждое разведение вакцины в объёме 1,0 мл смешивают с равным объёмом рабочего

разведения иммунной кроличьей сыворотки к штамму «Дакар» вируса желтой лихорадки и не иммунной кроличьей сыворотки, получая, таким образом, конечные разведения вакцины 1:10 и 1:100.

Иммунная кроличья сыворотка к штамму «Дакар» вируса желтой лихорадки в рабочем разведении должна нейтрализовать 100 – 300 БОЕ в 0,1 мл вируса желтой лихорадки, штамм 17Д. В реакции нейтрализации необходимо использовать то же разведение неиммунной кроличьей сыворотки, что и иммунной.

Смеси вирус-сыворотка выдерживают при температуре 37 ±1 °С в течение 1 ч.

Постановка реакции нейтрализации. Используют одну из указанных выше культур клеток.

Перед внесением на монослой культуры клеток смеси вирус–сыворотка, ростовую среду сливают и монослой промывают один раз раствором Эрла. Смесь вирус-сыворотка вносят в объёме 0,2 мл в каждые 3 флакона с ФЭК или в каждые 3 лунки планшетов с клетками PS или *Vero*.

Флаконы с ФЭК или планшеты с PS или *Vero* помещают в термостат при температуре 36±1 °С на 2 ч., периодически обкатывают монослой клеток смесью вирус – сыворотка путем покачивания флаконов или планшетов через каждые 15 – 20 мин.

После адсорбции вируса, на клеточный монослой наносят питательный агар, пригодный для данной культуры клеток.

Учёт результатов. Учёт результатов проводят на 5 сут при титровании в культуре клеток ФЭК или PS, или на 6–7 сут при титровании вируса в культуре клеток *Vero*. Подсчитывают количество бляшек отдельно в каждой лунке или флаконе. Затем вычисляют среднее количество бляшек из 3 лунок планшета или 3 флаконов, соответственно для каждого разведения вируса. Титр вируса с иммунной и не иммунной сыворотками подсчитывают, как

описано в разделе «Специфическая активность» и выражают в десятичных логарифмах БОЕ (бляшкообразующих единиц).

Индекс нейтрализации (подлинность вируса желтой лихорадки) представляет собой разницу lg титров вируса с не иммунной сывороткой и иммунной сывороткой и должен быть не менее 1,0 lg.

Время растворения. Не более 5 мин при добавлении 0,5 мл растворителя (вода для инъекций) на одну дозу вакцины. Определение проводят визуально.

Цветность. Восстановленный препарат – жидкость желтовато-розового цвета. Определение проводят визуально в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

Прозрачность. Восстановленный препарат – опалесцирующая жидкость желтовато-розового цвета. Оптическая плотность не более 0,6. Определение проводят фотометрическим методом при длине волны 540 нм в кюветах с толщиной слоя 3 мм. В качестве контроля используют воду.

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

Потеря в массе при высушивании. Не более 2,5 %. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Белковый азот. Не более 0,25 мг/доза. Определение проводят колориметрическим методом с реактивом Несслера в соответствии с ОФС «Определение белкового азота с реактивом Несслера с предварительным осаждением белкового материала в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Овальбумин. Не более 5,0 мкг/ доза. Определение проводят методом ИФА в соответствии с ОФС «Метод иммуноферментного анализа».

Стерильность. Должна быть стерильной. Определение проводят методом прямого посева или мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность».

Присутствие микоплазм. Не должна содержать микоплазм. Определение проводят микробиологическим методом в соответствии с ОФС «Испытание на присутствие микоплазм».

Бактериальные эндотоксины. Не более 5 ЕЭ/доза. Определение проводят методом гель-тромб тест в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

Аномальная токсичность. Должна быть нетоксична. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Тест-доза: морским свинкам – 1 доза вакцины подкожно, белым мышам по 1 дозе вакцины внутрибрюшинно.

Специфическая активность. Должна содержать в одной дозе не менее 1600 БОЕ вируса или 1000 LD_{50}. Определение проводят биологическим методом.

Определяют титр вируса в одной из культур клеток: первично-трипсинизированных фибробластах эмбрионов кур (ФЭК); перевиваемой культуре клеток почек эмбрионов свиньи (PS); перевиваемой культуре клеток почек зеленой мартышки (*Vero*) или на мышах Balb/c или СВА 4–6 недельного возраста массой 10–12 г (если в нормативной документации нет других указаний).

Для титрования используют по 3 ампулы вакцины отдельно. Содержимое каждой ампулы растворяют в растворителе (вода для инъекций), содержащем 2 % сыворотки крови плодов коровы, жидкой, инактивированной при температуре 56 $\pm$1 ^{0}C в течение 30 мин (для исключения возможности присутствия ингибиторов вируса желтой лихорадки). Используют по 0,5 мл растворителя на одну прививочную дозу.

ФГБУ «НМИЦ Государственной ветеринарии» Электронная библиотека

Восстановленную вакцину выдерживают при температуре 18- 20 ^{0}С в течение 15 – 20 мин. Затем проводят титрование (раздел «Подлинность»).

Каждое испытание специфической активности вакцины желтой лихорадки должно проводится с использованием стандартного образца (СО) вакцины желтой лихорадки, откалиброванного по Международному стандарту вакцины желтой лихорадки. Одну ампулу стандартного образца титруют три раза для подтверждения достоверности каждого количественного определения активности.

Определение специфической активности вакцины (титр в БОЕ). Определение специфической активности (титр в *БОЕ*) вакцины проводят путем титрования вируса методом бляшек в культурах клеток ФЭК, PS или *Vero*.

Готовят последовательные разведения вакцины: 1:10; 1:100; 1:000; 1:10000 в 0,9 % растворе натрия хлорида с 2 % раствором сыворотки крови плодов коровы, жидкой, инактивированной при температуре 56 $\pm$1 ^{0}С в течение 30 мин (для исключения возможности присутствия ингибиторов вируса желтой лихорадки). Каждое разведение в объёме 0,1 мл вносят в три флакона вместимостью 100,0 мл с полностью сформировавшимся монослоем клеток ФЭК или в три лунки 6-ти или 12-ти луночных планшетов с полностью сформировавшимся монослоем культур клеток *Vero* или PS.

Инфицированные клетки во флаконах или планшетах помещают на 2 ч в термостат при температуре 37 $\pm$1 ^{0}С. Через каждые 15–20 мин проводят «обкатывание» монослоя клеток вируссодержащей жидкостью путем покачивания флаконов или планшетов. По истечении периода адсорбции вируса в каждый флакон (или лунку планшета) наносят агаровое покрытие и инкубируют (раздел «Подлинность»).

Учёт результатов. Определение титра вируса желтой лихорадки проводят на 5 сут при титровании в культурах клеток ФЭК или PS, и на 6 -7 сут при титровании в культуре клеток *Vero*.

Подсчитывают количество бляшек отдельно в каждом флаконе (лунке), после чего определяют среднее количество бляшек для каждого разведения вируса и определяют концентрацию вируса в одной прививочной дозе вакцины (0,5 мл). Титр вируса (А) выражают в бляшкообразующих единицах (БОЕ/0,5 мл) и вычисляют по формуле:

$$A = \left[\frac{(X \cdot Y)}{0{,}1}\right] \cdot 0{,}5,$$

где: X – среднее количество бляшек из 3 флаконов или 3 лунок;

Y – разведение вакцины, мл;

0,1 – объём инокулята, внесенного в один флакон или одну лунку, мл;

0,5 – объём одной дозы вакцины, мл.

Титр вируса в СО желтой лихорадки должен соответствовать аттестационному значению.

Термостабильность. Титр вируса вакцины после прогревания при температуре от 36 до 38 °С в течение 2 недель не должен снижаться более, чем на 1,0 lg и должен быть не менее 1000 LD_{50} или 1600 БОЕ в одной дозе.

Для испытания используется не менее 6 ампул вакцины от каждой испытуемой серии. 3 ампулы хранят при температуре от 2 до 8 ^{0}С в течение 2 недель, 3 ампулы подвергают воздействию температуры 37 $\pm$1 ^{0}С в течение 2 недель. Затем проводят одновременное определение титра вируса во всех 6 ампулах в одной из культур клеток ФЭК, PS, *Vero* по методике, изложенной в разделе «Специфическая активность». Разница титра вакцины не прогретой и титра вакцины прогретой составляет показатель термостабильности препарата.

Упаковка и маркировка. Определение проводят в соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Дополнительная информация: На внешней упаковке (пачке с ампулами вакцины) указывают: «Стерильно», «Препарат не содержит консервантов и антибиотиков», «Хранить в недоступном для детей месте», «Для лечебно-

Федеральный ЭМБ Электронная медицинская библиотека

профилактических и санитарно-профилактических учреждений», «Для культивирования вируса используются куриные эмбрионы SPF – категории».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Вакцина клещевого энцефалита культуральная очищенная концентрированная инактивированная жидкая сорбированная или сухая в комплекте с растворителем алюминия гидроксида **ФС.3.3.1.0031.15**

Взамен ФС 42-3259-96

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину клещевого энцефалита, инактивированную формальдегидом, культуральную цельновирионную очищенную концентрированную, жидкую сорбированную на минеральном сорбенте – алюминия гидроксиде, или сухую с алюминия гидроксидом в качестве растворителя. Основным активным компонентом вакцины является инактивированный антиген (протективный поверхностный белок Е) вируса клещевого энцефалита (ВКЭ).

Вакцина не содержит антибиотиков и консервантов.

Вакцина предназначена для профилактики клещевого энцефалита и для иммунизации доноров с целью получения специфического иммуноглобулина.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство вакцины клещевого энцефалита должно быть организовано при соблюдении правил организации производства и контроля качества лекарственного препарата, гарантирующих качество и безопасность для человека, а также условий работы с вирусом 2 группы патогенности (опасности) – ВКЭ.

ФГБУ «ЭМБ» Федеральная электронная медицинская библиотека

Технология производства вакцины состоит из нескольких этапов.

1. Подготовка и ведение производственного штамма ВКЭ.

2. Подготовка и ведение первично-трипсинизированной культуры клеток куриного эмбриона (взвешенной или монослойной). В качестве субстрата для приготовления ВКЭ могут быть использованы перевиваемые клеточные линии, рекомендованные ВОЗ для этой цели, в частности, перевиваемая линия клеток *Vero*.

3. Заражение клеточной культуры, репродукция вируса и получение вирусного сбора.

4. Инактивация вирусного сбора формальдегидом, проведение очистки и концентрации вакцинного вирусного антигена, стабилизация антигена альбумином крови человека и сахарозой, получение готовой формы вакцины: сорбция жидкого антигена или его лиофилизация.

Размножение ВКЭ осуществляется на первично-трипсинизированной культуре клеток куриных эмбрионов. Куриные эмбрионы должны поступать из птицеводческих хозяйств, проверенных и аттестованных на отсутствие заболеваний птиц. Перед заражением вирусом клеточные культуры должны быть проверены на отсутствие контаминирующих агентов – вирусов, бактерий, грибов, микоплазм.

Состав. Доза вакцины содержит специфический инактивированный антиген ВКЭ – активный компонент, а также вспомогательные вещества (содержание расчетное), состав и количество которых на дозу вакцины указывают в нормативной документации предприятия.

При получении готовой формы вакцины могут применяться стабилизаторы активности очищенного концентрированного вакцинного антигена – 10 или 20 % растворы альбумина крови человека и сахароза. Перед использованием в производстве альбумин человека должен тестироваться валидированными методами на отсутствие антител к ВИЧ-1,

ВИЧ-2, к вирусу гепатита С и поверхностному антигену вируса гепатита В (HbsAg).

Производственные штаммы и тест-штаммы

Используются производственные штаммы ВКЭ, полученные путем пассирования ВКЭ через мозг нелинейных белых мышей. Для ведения производственного штамма используется система посевных серий. Исходный лиофилизированный производственный штамм хранится при температуре не выше минус 60 ^{0} С. Исходный производственный штамм служит источником получения штаммового запаса, маточного и посевного вируса путем пассажей вируса через мозг нелинейных белых мышей.

Полученный после заражения культуральный вирусный сбор подвергается инактивации формальдегидом с последующей очисткой и концентрацией вакцинного антигена методами ультрафильтрации и/или гель-хроматографии. Инактивированный вакцинный антиген контролируют на отсутствие живого ВКЭ.

При ведении штаммов на производстве должна использоваться система посевных серий, т.е. от исходного штамма до получения вирусного материала для заражения культуры клеток должно быть проведено не более 5 пассажей через мозг нелинейных белых мышей.

При приготовлении вирусного материала для получения новой серии производственного штамма ВКЭ должен проводиться контроль стерильности, биологической активности и типоспецифичности вируса.

Производственный штамм и тест-штамм ВКЭ должны отвечать следующим требованиям:

– не должны содержать контаминирующих агентов;

– индекс нейтрализации типоспецифическими иммунными сыворотками к ВКЭ в реакции нейтрализации при внутримозговом заражении нелинейных белых мышей массой 7 – 9 г, в возрасте 12 – 14 сут, не менее 1000;

– титр вируса при внутримозговом заражении нелинейных белых мышей массой 7 – 9 г возрастной категории 12 – 14 сут – не менее 8,5 lg LD_{50}/мл, при подкожном и внутрибрюшинном заражении мышей той же категории титр не менее 6,0 lg LD_{50}/мл.

Производственные лиофилизированные штаммы ВКЭ контролируются не реже 1 раза в 5 лет.

Для производства и контроля вакцины по показателю «Специфическая активность» должны использоваться вирулентные штаммы ВКЭ, выделенные из вирусофорных клещей или от больных/погибших от клещевого энцефалита людей.

Штаммы должны быть депонированы в официальной Государственной коллекции вирусов. Производственные или тест-штаммы должны быть закреплены на установленном уровне пассажей, лиофилизированы и заложены на долгосрочное хранение.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Гомогенная суспензия белого цвета без посторонних включений (для сорбированной жидкой вакцины). Пористая масса белого цвета, гигроскопична (для лиофилизированной вакцины). Определение проводят визуально.

Восстановленный препарат. Гомогенная непрозрачная суспензия белого цвета, при отстаивании разделяющаяся на бесцветную прозрачную жидкость и рыхлый осадок белого цвета. При встряхивании хлопья, конгломераты и посторонние частицы должны отсутствовать. Определение проводят визуально.

Подлинность. Должна вызывать специфический иммунитет к ВКЭ при иммунизации мышей линии Balb/c.

Определение проводят биологическим методом (раздел «Специфическая активность»).

Время растворения. Не более 3 мин (для лиофилизированной вакцины). Определение проводят визуально.

Механические включения. Должна соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в парентеральных лекарственных формах и глазных лекарственных формах».

Время седиментационной устойчивости. Суспензия, образующаяся при встряхивании, не должна расслаиваться в течение 3 мин. Определение проводят визуально.

Количественное определение антигена. Определение проводят методом иммуноферментного анализа (ИФА) в соответствии с ОФС «Метод иммуноферментного анализа» с использованием коммерческих наборов реагентов для выявления антигена ВКЭ. Проведение ИФА и учет результатов осуществляют согласно инструкции по применению набора реагентов. Титр антигена в вакцине клещевого энцефалита должен быть не менее 1:128. Методика должна быть изложена в нормативной документации. Возможно определение количества антигена ВКЭ в мкг/мл методом ИФА с помощью других валидированных наборов реагентов. Методика постановки должна быть изложена в нормативной документации.

Извлекаемый объём. Не менее номинального (для жидкой сорбированной вакцины). Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Потеря в массе при высушивании. Не более 2,0 % (для лиофилизированной вакцины). На 2 параллельных испытания отбирают 0,15 – 0,20 г испытуемого образца. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Содержание алюминия. От 0,60 до 1 мг/мл (для жидкой сорбированной вакцины).

Определение проводят методом комплексонометрического титрования в соответствии с ОФС «Определение ионов алюминия в сорбированных иммунобиологических препаратах».

Сахароза. От 20 до 60 мг/мл (для жидкой сорбированной вакцины).

Определение проводят колориметрическим методом в соответствии с ОФС «Определение сахаров спектрофотометрическим методом».

Формальдегид. Не более 20 мкг/мл (для жидкой сорбированной вакцины). Определение проводят колориметрическим методом в соответствии с ОФС «Количественное определение формальдегида в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Стерильность. Должна быть стерильной. Препарат (лиофилизированную вакцину) предварительно растворяют водой для инъекций. Определение проводят методом прямого посева или мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность».

Бактериальные эндотоксины. Не более 50 ЕЭ/мл. Определение проводят методом гель-тромб теста в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

Аномальная токсичность. Должна быть нетоксична. Препарат (лиофилизированную вакцину) предварительно растворяют водой для инъекций. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Тест-доза для морских свинок – по 1 дозе вакцины подкожно (если нет других указаний в нормативной документации предприятия), для белых мышей – по 1 дозе вакцины внутрибрюшинно, период наблюдения за животными составляет 7 сут.

pH. От 7,4 до 7,8. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Специфическая активность (иммуногенность). Должна быть специфически активна. Минимальная иммунизирующая доза вакцины

($МИД_{50}$) должна быть в пределах от 0,001 до 0,017 мл. Определение проводят биологическим методом.

Для проведения контроля используют необходимое количество образцов вакцины в зависимости от объема 1 прививочной дозы для дальнейшего приготовления 4 последовательных разведений. В качестве препарата сравнения применяется стандартный образец (СО) вакцины клещевого энцефалита, аттестованный в установленном порядке. Содержимое ампул вакцины или СО объединяют в одной емкости; средой, указанной в нормативной документации, готовят 4 последовательные разведения: для дозы 0,5 мл – 1:10; 1:32; 1:100; 1:320, а для дозы 0,25 мл – 1:5; 1:16; 1:50; 1:160. Для лиофилизированной вакцины клещевого энцефалита содержимое ампул предварительно растворяют в воде для инъекций. Емкости с приготовленными разведениями испытуемой вакцины и стандартного образца вакцины сохраняют на льду на время постановки опыта.

Для иммунизации используют мышей линии Balb/c массой 14 – 16 г, возрастной категории 40 – 42 сут, без различия пола. На каждое разведение испытуемой вакцины или СО используют по 10 мышей. Иммунизацию проводят трёхкратно с интервалом между инъекциями 1 – 3 сут. Животным вводят подкожно соответствующие разведения препаратов в объеме 0,5 мл (для вакцины в детской дозировке – 0,25 мл). Для каждой иммунизации готовят свежие разведения испытуемой вакцины и СО вакцины.

Одновременно в 1 день иммунизации комплектуют контрольную группу мышей той же партии для определения рабочей летальной дозы тест-штамма (LD_{50}). В качестве тест-штамма используют вирулентный штамм «Абсеттаров» ВКЭ.

Через 7 – 9 сут после третьей иммунизации мышам внутрибрюшинно вводят 0,25 мл рабочего разведения ВКЭ тест-штамма «Абсеттаров», приготовленного с использованием среды, указанной в нормативной

документации, и содержащего рабочую летальную дозу 100 – 1000 LD_{50}. Параллельно для подтверждения рабочей дозы ВКЭ (LD_{50}), взятой в испытания, используют рабочее разведение вируса и его десятикратные разведения. Рабочее разведение вируса; 1:10; 1:100; 1:1000; 1:10000. Разведения готовят на среде, указанной в нормативной документации. Указанные выше разведения ВКЭ вводят мышам контрольной группы внутрибрюшинно по 0,25 мл, используя по 6 мышей на каждое разведение вируса.

За животными ведут ежедневное наблюдение и регистрируют заболевших и павших мышей. Мышей, павших в течение первых 3 сут после заражения вирусом, исключают из опыта. Учёт результатов проводят на 14 сут после введения вируса.

На основании полученных результатов рассчитывают рабочую летальную дозу (LD_{50}) вирулентного вируса тест-штамма «Абсеттаров», введенного иммунизированным испытуемой вакциной или СО мышам, а также $МИД_{50}$ (минимальную иммунизирующую дозу).

1. Определение рабочей летальной дозы LD_{50} (PLD_{50}) вируса тест-штамма «Абсеттаров». Рабочая LD_{50} вируса, введенная иммунизированным мышам, должна содержать от 100 до 1000 LD_{50}/ 0,25 мл. Расчёт проводят по методу Рида и Менча (табл. 1).

Таблица 1 – **Определение рабочей LD_{50} тест-штамма «Абсеттаров»**

Разведение вируса	Количество мышей					Гибель, %
	всего	абсолютные данные		кумулятивные данные		
		погибло	выжило	погибло	выжило	
10^0 – «рабочее»	6	6	0	18	0	100
10^{-1}	6	6	0	12	0	100
10^{-2} (В)	6	4	2	6	2	75(в)
10^{-3}	6	2	4	2	6	25(а)
10^{-4}	6	0	6	0	12	0

Пример расчёта: Определение рабочей LD_{50} тест-штамма «Абсеттаров».

$$\lg \mathrm{PLD}_{50} = \lg B + \frac{в-50}{в-а} x(1) = 2{,}0 + \frac{75-50}{75-25} x(1) = 2{,}50;$$

$$\mathrm{PLD}_{50} = a \lg \mathrm{PLD}_{50} = a \lg (2{,}50) = 316{,}2;$$

где B – наибольшее разведение вируса, при котором наблюдается гибель более 50 % животных;

$в$ – процент летальности мышей при разведении вируса (В);

$а$ – процент летальности мышей при наименьшем разведении вируса, вызвавшем гибель менее 50 % животных.

Следовательно, реальная доза вируса, введенная мышам при испытании иммуногенности, содержала 316,2 LD_{50} вирулентного тест-штамма «Абсеттаров» в 0,25 мл.

2. *Определение МИД$_{50}$.* $МИД_{50}$ – минимальная иммунизирующая доза вакцины КЭ, которая выражается как отношение объема разовой дозы вакцины, введенной в опыте животным (в мл), к показателю $ПР_{50}$ (протективное разведение вакцины).

$ПР_{50}$ – это наименьшее разведение вакцины и/или СО, которое защищает 50 % иммунизированных мышей от гибели при заражении ВКЭ тест-штамма «Абсеттаров» в дозе от 100 – 1000 LD_{50}.

Для определения $МИД_{50}$ испытуемой серии или СО вакцины предварительно по методу Рида и Менча вычисляют протективное разведение вакцины и СО (табл. 2).

Таблица 2 – **Определение $ПР_{50}$ вакцины и/или СО**

Разведение вакцины	Количество мышей					% выживших мышей
	всего	абсолютные данные		кумулятивные данные		
		погибло	выжило	погибло	выжило	
1:10	10	0	10	0	18	61,54 (а) 18,75 (в)
1:32 (А)	10	5	5	5	8	
1:100	10	8	2	13	3	
1:320	10	9	1	22	1	

$$\lg ПР_{50} = \lg A + \frac{a - 50}{a - в} X(0{,}5) = 1{,}5 + \frac{61{,}54 - 50}{61{,}54 - 18{,}75} X(0{,}5) = 1{,}64;$$

$$ПР_{50} = a \lg ПР_{50}\ (1{,}64) = 43{,}65$$

где: A – наибольшее разведение вакцины, защищающее при иммунизации более 50 % мышей от гибели;

a – процент выживаемости мышей при иммунизации дозой вакцины (А);

$в$ – процент выживаемости мышей при наименьшем разведении вакцины, защищающем от гибели менее 50 % мышей;

0,5 – логарифм кратности разведения вакцины в опыте.

Минимальная иммунизирующая доза ($МИД_{50}$) рассчитывается отношением:

$МИД_{50}$ = объем разовой дозы вакцины (мл), введенной мышам/ $ПР_{50}$.

=Серия вакцины клещевого энцефалита считается специфически активной (иммуногенной), если минимальная иммунизирующая доза вакцины ($МИД_{50}$) находится в пределах от 0,001 до 0,017 мл; $МИД_{50}$ СО соответствует аттестованным характеристикам.

Для сопоставления результатов контроля испытуемой серии вакцины и СО возможно вычисление коэффициента сравнительной иммуногенности (K), при этом его значение должно быть больше или равно 0,5:

$$K = (0{,}0125 \cdot CT_2)/(L \cdot CT_1),$$

где: CT_1 – $МИД_{50}$ СО, указанный в свидетельстве на СО;

CT_2 – $МИД_{50}$ СО в данном опыте. CT_2 может иметь значения в интервале от 0,5 CT_1 до 2 CT_1;

L – $МИД_{50}$ исследуемой серии вакцины;

0,0125 – числовой коэффициент, соответствующий содержанию в объеме вакцины клещевого энцефалита, вводимом мышам однократно.

(0,5 мл), 40 $МИД_{50}$ (0,5/40 = 0,0125); (0,25 мл), 20 $МИД_{50}$ (0,25/20 = 0,0125).

При известном значении CT_1 = 0,007 рассчитывают значение коэффициента сравнительной иммуногенности:

$$K = \frac{0{,}0125 \cdot 0{,}009}{0{,}012 \cdot 0{,}007} = 1{,}3.$$

При неудовлетворительных результатах определение специфической активности (иммуногенности) повторяют, используя такое же количество образцов.

Необходимо соблюдать санитарные правила «Безопасность работы с микроорганизмами 1 – 2 групп патогенности (опасности)», т.к. выполнение контроля специфической активности вакцины связано с потенциальной опасностью заражения ВКЭ.

Полнота сорбции антигена. Полнота сорбции антигена ВКЭ должна составлять от 80 до 100 %. Метод предназначен для жидкой сорбированной вакцины.

Определение проводят методом ИФА по отношению иммуноферментной активности вакцинного антигена в образцах готовой формы вакцины и в надосадочной жидкости после центрифугирования образцов вакцины. Определение проводят по методике, изложенной в фармакопейной статье или нормативной документации.

Расчёт полноты сорбции антигена. Для расчёта полноты сорбции (ПС) вакцинного антигена на сорбенте – алюминия гидроксиде – вычисляют относительную активность антигена ВКЭ в надосадочной жидкости, сравнивая показатели A – оптические плотности разведений испытуемых образцов сорбированной вакцины и надосадочной жидкости методом параллельных линий (программа «PARALINE» или аналогичная).

Полноту сорбции (ПС) антигена ВКЭ определяют как разницу между 100 % (активность антигена в испытуемом образце вакцины) и полученным значением активности антигена в надосадочной жидкости (в %) по формуле:

$$\text{ПС} = 100\ \% - (A \cdot 100)\ \%,$$

где: A – значение относительной активности ВКЭ в надосадочной жидкости испытуемой вакцины, рассчитанное с помощью компьютерной программы «PARALINE» или другой аналогичной.

ФГБУ Федеральный электронный медицинский библиотека

Если по результатам ИФА во всех пробах надосадочной жидкости испытуемой вакцины антиген ВКЭ не выявляется (оптическая плотность испытуемых образцов ниже оптической плотности критической), то полнота сорбции вакцинного антигена в готовой вакцине равна 100 %, без проведения вычислений.

Растворитель, выпускаемый в комплекте с препаратом (для лиофилизированной вакцины). В состав растворителя входят гель алюминия гидроксида от 0,60 до 1 мг/мл и вода для инъекций до 1 мл.

Описание. Гомогенная непрозрачная суспензия белого цвета, при отстаивании разделяющаяся на бесцветную прозрачную жидкость и рыхлый осадок белого цвета. При встряхивании хлопья, конгломераты и посторонние частицы должны отсутствовать. Определение проводят визуально.

Содержание алюминия. От 0,60 до 1 мг/мл. Определение проводят комплексонометрическим методом титрования в соответствии с ОФС «Определение ионов алюминия в сорбированных иммунобиологических препаратах».

pH. От 5,5 до 8,5. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Время седиментационной устойчивости. Суспензия, образующаяся при встряхивании, не должна расслаиваться в течение 3 мин. Определение проводят визуально.

Стерильность. Должен быть стерильным. Не должен содержать бактерии и грибы. Определение проводят методом прямого посева или мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность».

Аномальная токсичность. Должен быть нетоксичен. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Тест-доза: морским свинкам – 0,5 мл подкожно (если нет других указаний в нормативной документации предприятия), белым мышам – 0,5 мл внутрибрюшинно; период наблюдения за животными составляет 7 сут.

Извлекаемый объём. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Упаковка и маркировка. Определение проводят в соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты». Дополнительно наносят предупредительные надписи: «Стерильно», «Перед употреблением встряхивать», «Замораживание не допускается», «Хранить в не доступном для детей месте», «Препарат не содержит консервантов и антибиотиков», «Препарат не содержит антитела к ВИЧ-1, 2, к гепатиту С и HbsAg».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Вакцина коревая культуральная живая	**ФС.3.3.1.0032.15** **Взамен ФС 42-3092-00**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину коревую культуральную живую (лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения), представляющую собой препарат, содержащий аттенуированный вакцинный штамм вируса кори Ленинград-16 (Л-16), выращенный на первичной культуре фибробластов эмбрионов перепелов (ФЭП).

Вакцина предназначена для плановой и экстренной профилактики кори.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство вакцины должно осуществляться с соблюдением установленных требований к правилам надлежащей организации производства и контроля качества лекарственных препаратов на всех этапах производства, в основе которого заложена система посевных вирусов.

В качестве субстрата для накопления вируса используют первичную культуру ФЭП.

Производство вакцины должно обеспечивать стабильность показателей качества готового продукта.

Качество исходного сырья и материалов, используемых в производстве, должно быть подтверждено соответствующими документами.

Состав вакцины. Одна прививочная доза препарата (0,5 мл) содержит:

– активный компонент: вирус кори – не менее 1000 (3,0 lg) тканевых цитопатогенных доз ($ТЦД_{50}$);

– вспомогательные вещества: стабилизатор, состав и количество которого указывают в нормативной документации; антибиотик – гентамицина сульфат – не более 10 мкг, если нет других указаний в нормативной документации.

Производственный штамм

Производственный штамм – вируссодержащая жидкость, приготовленная путем пассирования вакцинного штамма вируса кори в производственном клеточном субстрате. Производственный штамм должен быть идентифицирован с помощью документов, которые должны включать сведения о происхождении штамма, методе аттенуации и уровне пассажа, на котором аттенуация была подтверждена результатами клинических испытаний. С помощью соответствующих лабораторных методов и клинических испытаний на восприимчивых к кори людях должно быть доказано, что штамм вируса кори, используемый в производстве вакцины, безопасен и иммуногенен.

Производственный штамм вируса кори, приготовленный из вакцинного штамма Л-16, депонирован в официальной Государственной коллекции вирусов.

Производственный штамм должен отвечать следующим требованиям:

– быть специфичным;

– обладать генетической стабильностью;

– иметь специфическую активность не ниже 3,0 $lgТЦД_{50}$/0,5 мл;

– быть стерильным: не содержать бактерий, грибов, микоплазм, микобактерий туберкулеза и посторонних вирусов;

– должен обладать репродуктивной активностью: вызывать специфическую дегенерацию в чувствительных культурах клеток, сопровождающуюся накоплением вируса в питательной среде;

– не обладать аномальной токсичностью;

– не обладать остаточной нейровирулентностью при интрацеребральном введении обезьянам;

– не быть контагиозным;

– потеря в массе при высушивании должна быть не более 2,0 %;

– должен сохраняться в лиофилизированном виде при температуре минус (60±10) °С.

По указанным показателям должна быть проверена каждая новая серия производственного штамма.

Производственный штамм в процессе хранения должен быть проверен на генетическую стабильность (не реже 1 раза в 5 лет).

Примечание.

Испытание производственного штамма, посевного вируса, клеточной культуры, сыворотки крупного рогатого скота на присутствие микоплазм должно проводиться двумя методами: цитохимическим и микробиологическим. Испытание на присутствие микоплазм в вирусных сборах, нерасфасованной вакцине и готовом продукте следует проводить микробиологическим методом.

Посевной вирус

Посевной вирус – вируссодержащая жидкость, полученная путем однократного пассирования промежуточного пассажа производственного штамма на производственном субстрате, служит в качестве посевного материала для производства вакцины. Посевной вирус должен обладать теми же характеристиками, что и штамм, из которого он получен. Каждая серия посевного вируса должна быть идентифицирована как вирус кори с помощью соответствующих методов.

Каждая серия посевного вируса должна быть проверена на остаточную нейровирулентность, что определяют в тесте на обезьянах по ОФС «Оценка специфической безопасности производственных штаммов и посевных вирусов кори, паротита и краснухи».

Требования к специфической безопасности вакцины касаются не только отсутствия остаточной нейровирулентности, но также и наличия генетической стабильности производственного штамма и посевных серий. Следует оценивать генетическую стабильность новых посевных серий вируса кори так же, как и новых серий производственного штамма. Сравнительный анализ секвенированных последовательностей генома вируса в указанных производственных материалах должен подтвердить их идентичность структуре вакцинного штамма.

Методы культивирования должны обеспечивать сохранение иммуногенных свойств готового препарата, его безопасность и предотвращать контаминацию посторонними вирусами, бактериями, грибами и микоплазмами.

Пассажный уровень вируса в готовом препарате должен быть ограничен. Допускается пассирование производственного штамма и посевных вирусов в культуре ФЭП с таким расчетом, чтобы готовая вакцина содержала вирус, прошедший не более 10 пассажей от вакцинного штамма.

Особое внимание уделяют обеспечению стабильности таких параметров, как множественность заражения и условия культивирования (продолжительность и температура инкубации).

Рекомендуется хранить большой объем серии посевного вируса в качестве основного материала, который изготовитель должен использовать для производства коммерческих серий вакцины. Серии посевного вируса в лиофилизированном виде следует хранить при температуре ниже минус 20 °С, а в нелиофилизированном виде – при температуре ниже минус 60 °С.

Клеточный субстрат, используемый для производства

Субстратом для размножения и накопления вируса кори является первичная культура ФЭП. Оплодотворенное перепелиное яйцо должно быть получено от птиц, которые содержатся в изолированных специализированных хозяйствах, свободных от вирусов лейкоза птиц и других микроорганизмов, патогенных для птиц. Птиц в этих хозяйствах

систематически контролируют на отсутствие аденовируса птиц 1-ой, 3-ей и 4-ой групп, энцефаломиелита птиц, гриппа птиц типа А, парамиксовируса, реовируса, пневмовируса, вируса оспы и туберкулеза птиц, вируса анемии цыплят, инфекционного бронхита, бурсита и ларинготрахеита, лейкоза и микоплазмоза птиц, вирусов лимфоидного лейкоза, болезни Марека, болезни Ньюкастла, гемофильной инфекции, сальмонеллеза, пастереллеза, орнитоза и др. инфекционных заболеваний птиц.

При культивировании клеток не допускается использование нативной сыворотки крови человека.

Питательная среда для клеток может содержать pH-индикатор, например, феноловый красный, а также разрешенные антибиотики в минимальной эффективной концентрации. Не допускается использование пенициллина и стрептомицина.

Материалы от животных, которые используют при производстве вакцины, получают из хозяйств, благополучных в отношении бактериальных, вирусных, прионовых и других заболеваний, опасных для человека. Сыворотка крови крупного рогатого скота должна быть получена от животных из стада, в котором отсутствуют такие заболевания, как спонгиформная энцефалопатия и лейкоз крупного рогатого скота. Трипсин, используемый для приготовления клеточной культуры, не должен содержать микоплазм, цирко- и парвовирусов свиней, также должен быть испытан на отсутствие контаминации бактериями и грибами.

Вещества, вносимые в препарат

К веществам, вносимым в препарат, относят сыворотку крови крупного рогатого скота, которая используется для выращивания клеточной культуры. Сыворотка должна быть испытана на отсутствие контаминации вирусами, бактериями, грибами, микоплазмами.

Сыворотка крови животных должна быть удалена после инокуляции культуры клеток посевным вирусом. Перед сбором вируса культуру клеток отмывают, и ростовую среду заменяют бессывороточной поддерживающей

средой. Наличие остаточного количества бычьего сывороточного альбумина (БСА) не должно превышать 50 нг в одной прививочной дозе (0,5 мл). Определение проводят иммунохимическим методом на образце готовой серии.

Испытания на этапах производства

В процессе производства проводят исследование на присутствие контаминантов в культуральной жидкости, собранной с культур контрольных клеток, в образцах индивидуальных вирусных сборов и в образцах объединенных вирусных сборов. Индивидуальные вирусные сборы проверяют на стерильность и специфическую активность. Объединенные вирусные сборы проверяют на стерильность, присутствие микоплазм, микобактерий, посторонних вирусов, содержание белка, интактных клеток, специфическую активность. В готовой жидкой нерасфасованной вакцине проверяют специфическую активность, стерильность, присутствие микоплазм.

При производстве вакцины особое значение имеет постоянное выполнение на всех этапах производства внутрипроизводственного анализа основных показателей качества и анализа качества готового продукта при выпуске.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Лиофилизат – однородная пористая масса. Цвет лиофилизата указывают в нормативной документации. Определение проводят визуально.

Восстановленный препарат – прозрачная жидкость. Цветность восстановленного препарата указывают в нормативной документации. Определение проводят визуально.

Подлинность. Препарат должен содержать вирус кори. Определение проводят в реакции нейтрализации на культуре клеток *Vero*. Подлинность вируса кори в вакцине устанавливают на основании нейтрализации

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

цитопатогенного действия (ЦПД) вируса кори специфической иммунной сывороткой, содержащей антитела к вирусу кори. В реакции используют аттестованный стандартный образец коревых антител.

Время растворения. Препарат должен растворяться в течение 3 мин при внесении в ампулу растворителя для вакцины из расчета 0,5 мл на одну дозу. Определение проводят визуально.

Механические включения. Восстановленный препарат должен соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и в глазных лекарственных формах».

pH (восстановленного препарата)**.** От 7,2 до 7,8. если нет других указаний в нормативной документации. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Потеря в массе при высушивании. Не более 2,0 %. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Бычий сывороточный альбумин. Не более 50 нг в одной прививочной дозе. Определение проводят подходящим количественным иммунохимическим методом, указанным в нормативной документации.

Стерильность. Препарат не должен содержать бактерий и грибов. Определение проводят методом прямого посева или мембранной фильтрации с использованием тиогликолевой среды при двух температурных режимах в соответствии с ОФС «Стерильность».

Присутствие микоплазм. Препарат не должен содержать микоплазм. Определение проводят микробиологическим методом в соответствии с ОФС «Испытание на присутствие микоплазм». Если при испытаниях сырья и материалов при входном контроле и на всех контрольных точках в технологическом процессе контаминация микоплазмами надлежащими методами не обнаружена, то испытание готовой серии препарата на присутствие микоплазм может не проводиться.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичным. Определение проводят биологическим методом на белых мышах и на морских свинках обоего пола в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Животным вводят по одной прививочной дозе препарата в объеме 0,5 мл внутрибрюшинно, если нет других указаний в нормативной документации.

Специфическая активность. Прививочная доза (0,5 мл) должна содержать не менее 1000 (3,0 lg) $ТЦД_{50}$ вируса кори. Титр вируса определяют в каждой из 5 ампул серии готового препарата по ЦПД вируса на культуре клеток Vero. Каждый образец вакцины должен иметь специфическую активность не ниже регламентированной, в противном случае проводят повторный контроль специфической активности дополнительных 5 образцов, результат которого считают окончательным. Минимально регламентированное содержание вируса в прививочной дозе должно сохраняться в течение всего срока годности.

Одновременно с определением титра вируса в образцах серии проводят титрование стандартного образца (СО) активности вируса кори. Одну ампулу стандартного образца титруют три раза для подтверждения достоверности каждого количественного определения активности.

Учет результатов проводят по ЦПД с помощью инвертированного микроскопа (увеличение: объектив 10× – окуляр 10×) в сроки, указанные в нормативной документации.

Наибольшее разведение вакцины, вызывающее ЦПД в 50 % лунок с зараженной клеточной культурой, принимают за титр вируса. Титр вируса в вакцине рассчитывают по методу Рида и Менча или Спирмена-Кербера.

При титровании вакцины в лунки планшетов вносят по 0,1 мл каждого разведения вакцины, т.е. объем в 5 раз меньший, чем объем прививочной дозы. Для расчета активности вируса в прививочной дозе к титру вируса, рассчитанному в $lgТЦД_{50}$/0,1мл, добавляют постоянную величину, равную lg 5, т.е. 0,7.

Критерии приемлемости результатов:

– диапазон доверительного интервала (P=0,95) среднего значения титра СО, определенного при трехкратном титровании 1 ампулы, должен быть в пределах ± 0,3 lg $ТЦД_{50}$;

– титр вируса в СО не должен отличаться более, чем на 0,5 lg $ТЦД_{50}$ от аттестационного значения.

Термостабильность. Препарат должен быть термостабильным. Испытание проводят, определяя специфическую активность при одновременном титровании 5 образцов вакцины, инкубированных при температуре (37±1) °С в течение 7 сут, и 5 образцов вакцины, хранившихся при температуре от 2 до 8 °С. Препарат считают прошедшим испытание, если средняя геометрическая величина титра вируса в образцах после прогревании снижается не более, чем на 1 lg.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты»

Дополнительная информация: субстрат культивирования вируса и предупредительные надписи: «Хранить при температуре от 2 до 8 °С в недоступном для детей месте», «Избегать контакта вакцины с дезинфицирующими средствами».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С.

Федеральный электронный медицинский библиотека

Вакцина оспенная живая

ФС.3.3.1.0033.15
Взамен ГФ X, ст.727
ФС 42-3133-95

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину оспенную живую, применяемую в качестве иммунобиологического лекарственного препарата (ИЛП). Вакцина представляет собой лиофилизат, содержащий вирус осповакцины, выращенный на скарифицированной коже телят, частично освобожденный от бактериальной флоры обработкой хлоргексидина биглюконатом. Одна прививочная доза должна содержать не менее 10^6 ООЕ (оспообразующих единиц). Вакцина выпускается с растворителем – 50 % раствором глицерина, стабилизатор – пептон в конечной концентрации 5 – 10 %. Вакцина не содержит антибиотиков.

Вакцина предназначена для профилактики натуральной оспы по эпидемическим показаниям, вакцинации лиц, работающих с вирусами осповакцины и оспы животных, патогенными для человека.

ПРОИЗВОДСТВО

Все этапы производства вакцины должны быть валидированы в соответствии с установленными требованиями к правилам организации производства и контроля качества лекарственного препарата, гарантирующих его качество и безопасность для человека.

Производство оспенной вакцины должно проводиться в отдельных изолированных помещениях, в которых не допускается производство других лекарственных средств. Условия производства должны соответствовать

требованиям санитарных правил «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Этапы производства оспенной вакцины включают: получение оспенного соскоба с кожи телят; очистку оспенного соскоба от белка кожи телят центрифугированием; освобождение от микрофлоры путем обработки хлоргексидина биглюконатом; приготовление жидкой вакцины и внесение стабилизатора; розлив и герметизация ампул в атмосфере азота. В процессе производства обязательным является испытание качества исходных материалов, вакцинного штамма, ляпиновакцины I, II и III генераций посевного вируса. Также обязательным является определение содержания патогенных анаэробных микроорганизмов в 1 мл вакцины, которое необходимо проводить на производстве на этапе контроля готовой нерасфасованной продукции, до ее маркировки. Культивирование патогенных анаэробных микроорганизмов проводят в анаэробных условиях. Испытание должно проводиться с использованием питательных сред, пригодных для культивирования патогенных анаэробных микроорганизмов.

Определение проводят методом посева образцов вакцины на среду Тароцци с созданием анаэробных условий. Для испытания используют не менее 5 образцов препарата. Содержимое каждой ампулы с вакциной растворяют в 0,2 мл стерильного 0,004 М буферного фосфатно-цитратного раствора (ФЦБ) Мак-Илвейна.

Примечания.

1. Приготовление ФЦБ раствора Мак-Илвейна 0,004 М (pH 7,2 – 7,4). Готовят растворы 1 и 2.

Раствор 1: Лимонная кислота – 2,1 г; Вода очищенная – 100 мл.

Раствор 2: В мерной колбе вместимостью 1000 мл в воде очищенной растворяют 28,4 г натрия гидрофосфата безводного или 35,6 г натрия гидрофосфата дигидрата, или 71,6 г натрия гидрофосфата додекагидрата, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Смешивают 2 мл раствора 1 и 18 мл раствора 2 в мерной колбе вместимостью 1000 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки и

перемешивают. Полученный раствор должен иметь pH 7,2 – 7,4. Если pH полученного раствора более 7,4, его доводят до нормы раствором 1. В случае, если pH полученного раствора меньше 7,2, приготовление раствора повторяют. Буферный раствор стерилизуют при температуре (120 ± 1) °С и давлении (0,1 ± 0,01) МПа в течение 8 – 30 мин (в зависимости от объема) или фильтруют через мембраны с диаметром пор 0,22 мкм и хранят при температуре от 2 до 8 °С. Срок хранения от 10 до 30 сут в зависимости от способа укупорки флаконов (способ укупорки флаконов должен быть указан в нормативной документации).

Среда Тароцци:

- Гидролизат мяса (по Хоттингеру)[а)] – 250 мл;
- Ликадекс ПФ декстрозы моногидрат – 5 г;
- Натрия хлорид – 5 г;
- Агар микробиологический – 1 г;
- Фарш говяжий – 200 г;
- Вода очищенная – 1000 мл.

pH готовой среды (7,3 ± 0,2).

Готовую среду разливают в пробирки по 10 мл и стерилизуют при давлении (0,1 ± 0,01) МПа, температуре (120 ± 1) °С в течение 15 мин. Хранят при температуре от 2 до 8 °С не более 1 мес.

а) Гидролизат мяса (по Хоттингеру):

- Панкреатин 45 ед. – 20 г;
- Фарш говяжий – 500 г;
- Вода очищенная – 1000 мл.

Стерилизуют при давлении (0,1 ± 0,01) МПа, температуре (120 ± 1) °С в течение 15 мин. Хранят при температуре от 2 до 8 °С не более 1 мес.

б) Фарш говяжий (на 1 кг).

Вырезка говяжья – 1,05 кг.

Хранению не подлежит.

Используемая питательная среда для культивирования патогенных анаэробных микроорганизмов должна обеспечивать рост соответствующих тест-штаммов. Обязательным условием при производстве препарата является определение посторонних примесей – хлоргексидина биглюконата, который используют в виде 0,5 % раствора для обработки шкур телят с оспенным детритом. Содержание примеси хлоргексидина биглюконата определяют в полуфабрикате на стадии получения оспенного соскоба. Содержание

хлоргексидина биглюконата в полуфабрикате не должно превышать 0,05 % при определении спектрофотометрическим методом.

Требования к животным. В качестве продуцентов для производства оспенной вакцины и посевного материала используют телят крупного рогатого скота в возрасте от 6 до 18 мес любой породы, предпочтительно светлой масти. Животные должны поступать из хозяйств, благополучных в отношении инфекционных агентов, в том числе прионовой природы. Каждая партия животных должна сопровождаться ветеринарным свидетельством, подтверждающим отсутствие инфекционных заболеваний. Все поступившие телята должны пройти 30-дневный карантин.

Требования к производственному штамму. В качестве вакцинного штамма используют вирус осповакцины, штамм Л-ИВП, полученный путем накожных пассажей на кроликах и телятах вакцины, изготовленной из штамма Lister института Листера (Великобритания). Штамм Л-ИВП хранится в коллекции производственных штаммов на предприятии-изготовителе. Для поддержания стабильных свойств штамма проводят 1 пассаж исходного штамма на коже кролика. Материалом исходного штамма служит ляпино-вакцина III генерации. В результате пассирования исходного штамма на кроликах получают ляпину. Посевной вирус I генерации получают в результате пассажа ляпины на коже теленка. Посевной вирус II генерации получают путем пассажа посевного вируса I генерации на коже теленка. Для приготовления вакцины используют только ляпиновакцину III генерации. Взвесь посевного вируса должна отвечать следующим требованиям:

- может содержать суммарно не более 50 посторонних микроорганизмов в 1 мл, в том числе аэробных и факультативно-анаэробных бактерий и грибов;

- не должна содержать бактерий семейства *Enterobacteriaceae* и вида *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*, а также патогенных анаэробных бактерий;

- быть генетически однородной: допускается образование на хорионаллантоисных оболочках куриных эмбрионов (ХАО КЭ) не более 10 поражений поверхностного диффузного типа на 1000 типичных оспин (от 0,5 до 3 мм);

- на скарифицированной коже кроликов образовывать типичные вакцинальные поражения (оспины);

- не вызывать некрозы при внутрикожном введении кроликам 10^4 ООЕ/0,1 мл (ООЕ – оспообразующие единицы);

- не вызывать гибель кроликов при введении в мозг 10^4 ООЕ/0,1 мл;

- быть безвредной для морских свинок при введении подкожно 1 мл посевного вируса и для белых мышей при введении 0,2 мл посевного вируса подкожно;

- иметь специфическую активность не менее $1 \cdot 10^9$ ООЕ/мл.

Производственный штамм контролируется при получении каждой генерации посевного вируса.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Пористая масса от бело-серого до светло-желтого цвета, гигроскопичная.

Подлинность. Вакцина должна вызывать на хорионаллантоисных оболочках (ХАО) 12-дневных куриных эмбрионов образование белых плотных поражений диаметром от 0,5 до 3 мм (испытания проводят одновременно с испытанием специфической активности оспенной вакцины). Вызывать типичные вакцинальные поражения (оспины) при накожном введении кроликам. Испытание проводят на 2 белокожих кроликах породы Шиншилла массой от 2,5 до 3,5 кг. На предварительно депиллированные и скарифицированные участки кожи кроликов площадью около 5 $см^2$ наносят по 0,1 мл вакцины в разведениях 10^{-3}, 10^{-4} и 10^{-5}. Для разведения используют 0,9 % раствор натрия хлорида. Испытания осуществляют параллельно со

стандартным образцом активности специфичности и некротической активности оспенной вакцины.

Через 5 – 7 сут у животных обеих групп на зараженных участках кожи должны образовываться типичные вакцинальные поражения (оспины).

При неудовлетворительных результатах контроль повторяют, как при первичном испытании. При получении неудовлетворительных результатов при повторном испытании серию препарата бракуют.

Время растворения. Должна растворяться в 0,3 мл 50 % раствора глицерина в течение 1 мин при перемешивании стеклянной палочкой. После растворения вакцина должна представлять собой опалесцирующую жидкость от беловато-серого до светло-желтого цвета без осадка и посторонних включений. Определение проводят визуально.

pH (восстановленного препарата). От 6,5 до 7,5. Испытания проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Потеря в массе при высушивании. Не более 3,0 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании». При получении неудовлетворительных результатов контроль повторяют на удвоенном количестве образцов. При получении неудовлетворительных результатов при повторном испытании серию препарата бракуют.

Микробиологическая чистота. 1 мл растворенной вакцины должен содержать суммарно не более 50 микроорганизмов, в том числе аэробных и факультативно-анаэробных бактерий и грибов; бактерии семейства *Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus* должны отсутствовать. Содержимое ампул с вакциной растворяют до первоначального объема в 0,004 М стерильном ФЦБ растворе Мак-Илвейна. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

Аномальная токсичность. Должна быть нетоксичной. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Испытание проводят на 5 здоровых белых мышах массой 10 – 12 г и 2 морских свинках массой 250 – 300 г.

Вакцину растворяют до первоначального объема, указанного на ампуле, стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида и вводят подкожно морским свинкам в объеме 1 мл, белым мышам в объёме 0,2 мл. Наблюдение за животными проводят в течение 7 сут. Все животные должны оставаться живыми, признаки интоксикации и уменьшение массы тела должны отсутствовать. В случае гибели или появления признаков интоксикации или снижения массы тела у 1 животного испытание повторяют.

Вакцина выдерживает испытание, если ни 1 животное из второй группы не погибнет, не появятся признаки интоксикации и не будет отмечено уменьшение массы тела.

Специфическая активность. Вакцина должна иметь активность не менее $1 \cdot 10^8$ ООЕ/мл и не более $2 \cdot 10^9$ ООЕ/мл. Испытания проводят биологическим методом на хорионаллантоисных оболочках 12-дневных куриных эмбрионов (КЭ) от кур породы «Леггорн», «Роменбраун», «Родонит-2», «Изобраун» или «Хайсек», или пород кур, эмбрионы которых чувствительны к вирусу осповакцины.

Примечание. Куриные эмбрионы получают из хозяйств, свободных от вирусных и других возбудителей, патогенных для человека.

Контроль специфической активности вакцины проводят одновременно с определением специфической активности стандартного образца активности, специфичности и некротической активности оспенной вакцины.

Подготовка куриных эмбрионов. Проводят овоскопию куриных эмбрионов в затемненном помещении. Каждый эмбрион просматривают в направленном пучке света. Свет должен падать сверху на тупой конец яйца. Яйцо с погибшим эмбрионом, или имеющее кровоизлияние под оболочкой, бракуют. В центре воздушного мешка на тупом конце яйца и на боковой поверхности яйца на участке между сосудами и их ответвлениями карандашом делают отметку. В местах отметок с соблюдением правил асептики пропиливают бормашиной с абразивным диском отверстия (щели)

длиной 3 – 4 мм и шириной 1,5 мм, не повреждая оболочки. Яйцо укладывают так, чтобы отверстие на боковой стороне было обращено вверх. Подскорлупную оболочку в центре воздушного мешка прорывают плоской полукруглой хирургической иглой. Затем на отверстие, расположенное на боковой поверхности, вносят 0,1 мл 0,004 М стерильного ФЦБ раствора Мак-Илвейна, подогретого до температуры (50 ± 5) °С, и той же иглой осторожно продавливают подскорлупную оболочку. После этого практически вся капля раствора проходит под подскорлупную оболочку и частично отслаивает ХАО.

Из отверстия в центре воздушного мешка резиновой грушей осторожно отсасывают воздух до полного опускания ХАО и создания искусственного воздушного мешка под боковой щелью. Для контроля наличия и величины искусственного воздушного мешка вновь проводят овоскопию и бракуют эмбрионы, имеющие кровоизлияния, воздушные мешки под ХАО или без искусственных воздушных мешков. Яйца с опущенной ХАО помещают на лотки отверстием вверх и выдерживают 2 ч в термостате при температуре (37 ± 1) °С. Затем проводят овоскопию повторно и бракуют эмбрионы с воздушными мешками под ХАО, без искусственных воздушных мешков и эмбрионы с кровоизлияниями.

Приготовление десятикратных разведений. Для приготовления разведений используют стерильный ФЦБ. Готовят 7 десятикратных разведений: в штатив устанавливают 7 пробирок, которые маркируют от 10^{-1} до 10^{-7}. В первую пробирку вносят 4 мл ФЦБ. В последующие 6 пробирок вносят по 4,5 мл ФЦБ. Вскрывают 2 ампулы с вакциной и растворяют их содержимое в 0,5 мл ФЦБ, взятом из первой пробирки с маркировкой 10^{-1}. Полученный раствор из 2 ампул переносят пипеткой в пробирки с маркировкой 10^{-1}. Этой же пипеткой тщательно перемешивают раствор в пробирке и переносят 0,5 мл в пробирку с маркировкой 10^{-2}, не касаясь пипеткой жидкости, после чего меняют пипетку. Аналогичным образом

готовят последующие разведения до разведения 10^{-7}, меняя пипетки после каждого разведения.

Постановка основного опыта. Для заражения эмбрионов используют разведения вакцины 10^{-6} и 10^{-7}. Каждое разведение вируса вводят на ХАО 6 куриных эмбрионов по 0,1 мл в отверстие на боковой поверхности яйца. Круговым вращением яйца вирус равномерно распределяют по ХАО. Инокулированные эмбрионы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 42 – 48 ч. Затем эмбрионы вскрывают, разрезая скорлупу по длинной оси яйца, визуально определяют жизнеспособность куриного эмбриона. Изолируют пинцетом ХАО, промывают в воде и подсчитывают число оспин на каждой ХАО. Среднеарифметическое количество типичных оспин, развившихся на ХАО в учетном разведении, должно быть не менее 10. Специфическую активность вируса выражают в оспообразующих единицах в 1 мл (ООЕ/мл) и вычисляют по формуле:

$$\text{ООЕ/мл} = \frac{\text{среднее арифметическое число оспин на ХАО}}{\text{объем инфицирующей дозы} \cdot \text{разведение вируса}}$$

Контроль специфической активности вакцины проводят одновременно с определением специфической активности стандартного образца активности, специфичности и некротической активности оспенной вакцины в соответствии с инструкцией по применению.

Результат испытания серии вакцины принимают к учету при получении удовлетворительного результата определения специфической активности стандартного образца.

При получении неудовлетворительных результатов контроля серии вакцины проводят повторное испытание на удвоенном количестве образцов вакцины: разведение 10^{-1} получают растворением содержимого 4 ампул вакцины в 8 мл ФЦБ.

При получении неудовлетворительных результатов при повторном испытании серию препарата бракуют.

Некротическая активность. Вакцина в дозе 10^4 ООЕ/0,1 мл не должна вызывать некрозы при внутрикожном введении кроликам. Испытание проводят на 2 белокожих кроликах породы Шиншилла массой от 2,5 до 3,5 кг. Шерсть на боках в местах предполагаемых прививок удаляют. Для проведения испытания вакцину разводят стерильным ФЦБ до содержания 10^3; 10^4 и 10^5 ООЕ в 0,1 мл. Каждое разведение вакцины вводят кролику внутрикожно по 0,1 мл в 2 участка. Для проверки чувствительности кроликов к вирусу осповакцины тем же кроликам аналогичным образом на другом боку вводят по 0,1 мл растворы стандартного образца активности, специфичности и некротической активности оспенной вакцины с концентрацией 10^3; 10^4 и 10^5 ООЕ/0,1мл. Наблюдение за животными проводят в течение 4 – 5 сут.

Учет результатов. В местах инъекций вируса в дозе 10^4 ООЕ/0,1 мл не должны образовываться некрозы. Допустимо наличие ограниченных инфильтратов розового цвета. При появлении некрозов в дозе 10^4 ООЕ/0,1 мл хотя бы у 1 кролика и их отсутствие при введении стандартного образца испытание повторяют. При развитии некрозов после повторного испытания хотя бы у 1 кролика вакцину бракуют. При наличии некрозов в опыте со стандартным образцом активности, специфичности и некротической активности оспенной вакцины контроль повторяют.

Термостабильность. Вакцина должна быть термостабильной. Для проведения контроля вакцину прогревают при температуре (37 ± 1) °С в течение 28 сут. Затем проводят контроль специфической активности прогретых образцов вакцины с одновременным контролем стандартного образца активности, специфичности и некротической активности оспенной вакцины (раздел «Специфическая активность»). Возможно проведение контроля одновременно с контролем специфической активности препарата в одном испытании. Вакцину считают термостабильной, если после прогревания она имеет специфическую активность не менее 10^8 ООЕ/мл.

При получении неудовлетворительных результатов контроля серии вакцины проводят повторное испытание на удвоенном количестве образцов вакцины: разведение 10^{-1} получают растворением содержимого 4 ампул вакцины в 8 мл ФЦБ.

При получении неудовлетворительных результатов при повторном испытании серию препарата бракуют.

Примечание. При необходимости экстренного контроля допускается прогревание вакцины при температуре (61 ± 1) °С в течение 5 ч.

Растворитель, выпускаемый в комплекте с препаратом

Растворитель – 50 % раствор глицерина, готовят из глицерина на 0,004 М ФЦБ растворе Мак – Илвейна.

Описание. Прозрачная бесцветная сиропообразная жидкость без запаха.

Подлинность. Должен давать характерную реакцию на трехатомный спирт. К 3 мл растворителя прибавляют 10 капель 10 % раствора меди сульфата и 0,2 мл 10 % раствора натрия гидроксида, должно появиться синее окрашивание, не изменяющееся при кипячении.

pH. От 6,8 до 7,4. Испытания проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Количественное определение. Массовую долю глицерина в растворителе определяют по плотности в соответствии с ОФС «Плотность». Показатель плотности растворителя должен быть в пределах от 1,113 до 1,140 г/см^3, что соответствует массовой доле глицерина 45 – 55 %.

Стерильность. Должен быть стерильным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Стерильность», если в нормативной документации нет иных указаний.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С. Допускается однократное кратковременное транспортирование при температуре от 9 до 20 °С (не более 24 ч).

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Вакцина оспенная инактивированная	**ФС.3.3.1.0034.15** **Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину оспенную инактивированную, применяемую в качестве иммунобиологического лекарственного препарата (ИЛП). Вакцина представляет собой вирус осповакцины, выращенный на скарифицированной коже телят, обработанной хлоргексидина биглюконатом и инактивированный гамма-излучением Co^{60}. Одна прививочная доза вакцины содержит активный компонент – инактивированный антиген вируса осповакцины – 50 мкг (величина расчетная определяется по содержанию общего белка); стабилизаторы: желатин – 1 % и сахароза – 5 % в конечной концентрации; соли буферной системы – натрия гидрофосфат додекагидрат и лимонная кислота моногидрат. Вакцина не содержит антибиотиков и консервантов.

Вакцина предназначена для вакцинации детей с двухлетнего возраста, подростков и взрослых на первом этапе при двухэтапном методе вакцинации; на втором этапе применяют вакцину оспенную живую.

ПРОИЗВОДСТВО

Все этапы производства вакцины должны осуществляться с соблюдением установленных требований к правилам организации производства и контролю качества лекарственного препарата, гарантирующих его качество и безопасность для человека.

Производство вакцины оспенной инактивированной должно проводиться в отдельных изолированных помещениях, в которых не

Федеральный электронный медицинский фонд

допускается производство других лекарственных средств. Условия производства должны соответствовать требованиям санитарных правил «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Этапы производства включают получение оспенного соскоба с кожи телят; очистку оспенного соскоба от белка кожи центрифугированием; приготовление жидкой вакцины; инактивацию гамма-излучением Co^{60} и внесение стабилизатора; розлив и герметизацию ампул в атмосфере азота.

В процессе производства обязательным является испытание качества исходных материалов, ляпиновакцины I, II и III генераций посевного вируса. Определение общего белка проводят в полуфабрикате вакцины после разведения буферным раствором до добавления стабилизатора. Определение проводят колориметрическим методом в соответствие с ОФС «Определение белкового азота с реактивом Несслера с предварительным осаждением белкового материала в иммунобиологических лекарственных препаратах». Регламентированная норма 100 – 200 мкг/мл.

Обязательным условием при производстве препарата является определение посторонних примесей (хлоргексидина биглюконата), использующегося в виде 0,5 % раствора для обработки шкур телят с оспенным детритом. Содержание примеси хлоргексидина биглюконата определяют в полуфабрикате на стадии получения оспенного соскоба. Содержание хлоргексидина биглюконата в полуфабрикате не должно превышать 0,05 % при определении спектрофотометрическим методом.

Требования к животным. В качестве продуцентов для производства вакцины оспенной инактивированной и посевного материала используют телят крупного рогатого скота. Животные должны поступать из хозяйств, благополучных в отношении инфекционных агентов, в том числе и прионовой природы. Каждая партия животных должна сопровождаться ветеринарным свидетельством, подтверждающим отсутствие инфекционных заболеваний. Все поступившие телята должны пройти 30-дневный карантин.

Требования к производственному штамму. В качестве вакцинного штамма используют вирус осповакцины, штамм Л-ИВП, полученный путем накожных пассажей на кроликах и телятах вакцины, приготовленной из штамма Lister института Листера (Великобритания). Штамм Л-ИВП хранится в коллекции производственных штаммов на предприятии-изготовителе. Для поддержания стабильных свойств штамма проводят 1 пассаж исходного штамма на коже кролика. Материалом исходного штамма служит ляпиновакцина III генерации. В результате пассирования исходного штамма на кроликах получают ляпину. Посевной вирус I генерации получают в результате пассажа ляпины на коже теленка. Посевной вирус II генерации получают путем пассажа посевного вируса I генерации на коже теленка. Для приготовления вакцины используют только ляпиновакцину III генерации. Взвесь посевного вируса должна отвечать следующим требованиям:

- может содержать суммарно не более 50 посторонних микроорганизмов в 1 мл, в том числе аэробных и факультативно-анаэробных бактерий и грибов;

- не должна содержать бактерий семейства *Enterobacteriaceae* и вида *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*, а также патогенных анаэробных бактерий;

- быть генетически однородной, допускается образование на хорионаллантоисных оболочках (ХАО) куриных эмбрионов не более 10 поражений поверхностного диффузного типа на 1000 типичных оспин (от 0,5 до 3 мм);

- на скарифицированной коже кроликов образовывать типичные вакцинальные поражения (оспины);

- не вызывать некрозы при внутрикожном введении кроликам 10^4 ООЕ/0,1 мл (ООЕ – оспообразующие единицы);

- не вызывать гибель кроликов при введении в мозг 10^4 ООЕ/0,1 мл;

- быть безвредной для морских свинок при введении подкожно 1 мл посевного вируса и для белых мышей при введении 0,2 мл посевного вируса подкожно;

- иметь специфическую активность не менее $1 \cdot 10^9$ ООЕ/мл.

Производственный штамм контролируется при получении каждой генерации посевного вируса.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Пористая масса от белого до серо-белого цвета, гигроскопичная.

Подлинность. Вакцина должна вызывать образование вируснейтрализующих антител к вирусу осповакцины в сыворотке крови белых крыс, однократно иммунизированных внутривенно 1 дозой вакцины. Определение проводят в соответствии с разделом «Антигенная активность».

При неудовлетворительных результатах контроль повторяют, как при первичном испытании. При повторном испытании при получении неудовлетворительных результатов серию препарата бракуют.

Время растворения. Должна полностью растворяться в 0,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида при встряхивании в течение 3 мин. Метод определения – визуальный. После растворения вакцина должна представлять собой бесцветную или желтоватого цвета опалесцирующую жидкость.

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH (восстановленного препарата)**.** От 6,8 до 7,6. Испытания проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Потеря в массе при высушивании. Не более 3,0 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Стерильность. Вакцина должна быть стерильной. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Стерильность», если в нормативной документации нет других указаний.

Пирогенность. Должна быть апирогенной. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Тест - доза вводимого препарата должна составлять 0,5 мл на кролика.

Аномальная токсичность. Должна быть нетоксичной. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Тест-доза – по 0,5 мл подкожно 2 морским свинкам массой 250 – 300 г и по 0,5 мл внутрибрюшинно 5 белым мышам массой 17 – 20 г. Вакцину растворяют прилагаемым растворителем.

При получении неудовлетворительных результатов контроль повторяют на удвоенном количестве образцов. При получении неудовлетворительных результатов при повторном испытании серию препарата бракуют.

Специфическая безопасность. Не должна содержать живого вируса осповакцины. Полноту инактивации вируса осповакцины испытывают на ХАО 12-дневных куриных эмбрионов (КЭ).

Примечание**.** Используют КЭ от кур породы «Леггорн», «Роменбраун», «Родонит-2», «Изобраун» или «Хайсек» или пород кур, эмбрионы которых чувствительны к вирусу осповакцины. КЭ получают из хозяйств, свободных от вирусных и других возбудителей, патогенных для человека.

Подготовка КЭ. Проводят овоскопию КЭ в затемненном помещении. Каждый эмбрион просматривают в направленном пучке света. Свет должен падать сверху на тупой конец яйца. Яйцо с погибшим эмбрионом или с кровоизлиянием под оболочкой бракуют. В центре воздушного мешка на тупом конце яйца и на боковой поверхности яйца, на участке между сосудами и их ответвлениями карандашом делают отметку. В местах отметок с соблюдением правил асептики пропиливают бормашиной с абразивным диском отверстия (щели) длиной 3 – 4 мм и шириной 1,5 мм, не повреждая

оболочки. Яйцо укладывают так, чтобы отверстие на боковой стороне было обращено вверх. Подскорлупную оболочку в центре воздушного мешка прорывают плоской полукруглой хирургической иглой. Затем на отверстие, расположенное на боковой поверхности, вносят 0,1 мл 0,004 М стерильного фосфатно-цитратного буферного (ФЦБ) раствора Мак-Ильвейна, подогретого до температуры (50 ± 5) °С, и той же иглой осторожно продавливают подскорлупную оболочку. После этого практически вся капля раствора проходит под подскорлупную оболочку и частично отслаивает ХАО.

Из отверстия в центре воздушного мешка резиновой грушей осторожно отсасывают воздух до полного опускания ХАО и создания искусственного воздушного мешка под боковой щелью. Для контроля наличия и величины искусственного воздушного мешка вновь проводят овоскопию и бракуют эмбрионы, имеющие кровоизлияния, воздушные мешки под ХАО или без искусственных воздушных мешков. Яйца с опущенной ХАО помещают на лотки отверстием вверх и выдерживают 2 ч в термостате при температуре (37 ± 1) °С. Затем проводят овоскопию повторно и бракуют эмбрионы с воздушными мешками под ХАО, без искусственных воздушных мешков и с кровоизлияниями.

Постановка основного опыта. При испытании специфической безопасности вакцины используют 20 подготовленных КЭ и 10 ампул вакцины. Содержимое ампулы с вакциной растворяют в 0,5 мл ФЦБ. Содержимое каждой ампулы контролируют на 2 эмбрионах. По 0,1 мл растворенной вакцины наносят на ХАО одного эмбриона и равномерно распределяют по оболочке осторожным круговым вращением яйца. Инокулированные эмбрионы укладывают отверстием на боковой поверхности вверх и помещают в термостат на 48 ч при температуре (37 ± 1) °С, затем проводят учет результатов. Параллельно определяют чувствительность КЭ к вирусу осповакцины. Для этого используют не менее 12 подготовленных КЭ и стандартный образец активности, специфичности и некротической активности оспенной вакцины в соответствии с инструкцией

по применению. Инкубируют параллельно с основным опытом. Через 48 ч КЭ вскрывают, разрезая скорлупу по длинной оси яйца. Отслаивают пинцетом участок ХАО, выстилающий полость искусственного мешка, и отмывают его от крови и белка водой или ФЦБ. Каждую оболочку просматривают на черном фоне на наличие поражений. Препарат не должен вызывать специфических поражений на ХАО куриных эмбрионов. В тесте должно быть подтверждено установленное значение показателя «Специфическая активность» стандартного образца активности, специфичности и некротической активности оспенной вакцины. При соблюдении данных условий делают заключение об отсутствии живого вируса в испытуемом образце вакцины.

В случае обнаружения типичных оспин в основном опыте проводят контроль удвоенного количества испытуемых образцов вакцины. При повторном обнаружении типичных оспин на ХАО КЭ испытуемую вакцину бракуют. В случае обнаружения неспецифических поражений, участок ХАО измельчают и готовят суспензию в 2 мл ФЦБ. Взвесь центрифугируют в течение 15 мин при 2000 об/мин. Надосадочную жидкость наносят по 0,1 мл на ХАО куриных эмбрионов. Отсутствие типичных поражений считают доказательством инактивации вируса. При обнаружении на ХАО КЭ специфических оспин вакцину бракуют.

Примечания.

1. Приготовление ФЦБ раствора Мак-Ильвейна 0,004 М, pH (7,2 – 7,4). Готовят растворы 1 и 2.

Раствор 1: Лимонная кислота – 2,1 г; Вода очищенная – 100 мл.

Раствор 2: В мерной колбе вместимостью 1000 мл в воде очищенной растворяют 28,4 г натрия гидрофосфата безводного или 35,6 г натрия гидрофосфата дигидрата, или 71, 6 г натрия гидрофосфата додекагидрата, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Смешивают 2 мл раствора 1 и 18 мл раствора 2 в мерной колбе вместимостью 1000 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Полученный раствор должен иметь pH 7,2 – 7,4. Если pH полученного раствора более 7,4, его доводят до нормы раствором 1. В случае, если pH полученного раствора меньше 7,2, приготовление раствора

повторяют. Буферный раствор стерилизуют при температуре (120 ± 1) °С и давлении (0,1 ± 0,01) МПа в течение 8 – 30 мин (в зависимости от объема) или фильтруют через мембраны с диаметром пор 0,22 мкм и хранят при температуре от 2 до 8 °С. Срок хранения от 10 до 30 сут в зависимости от способа укупорки флаконов (способ укупорки флаконов должен быть указан в нормативной документации).

Антигенная активность. Среднегеометрический титр (СГТ) вируснейтрализующих антител (ВНА) к вирусу осповакцины в сыворотках крови белых крыс, иммунизированных внутривенно 1 дозой вакцины, должен быть не менее 1:80. Контроль проводят на 6 белых крысах массой 80 – 100 г линии Wistar или нелинейных белых крысах без различия пола. Крысам вводят внутривенно в хвостовую вену растворенный препарат испытуемой вакцины в объеме 0,5 мл. Через 28 сут производят взятие крови от каждой крысы и получают сыворотки. Для контроля опыта получают нормальную сыворотку крови от неиммунной крысы. Все полученные сыворотки прогревают при температуре (56 ± 1) °С в течение 30 мин и исследуют в реакции нейтрализации. Постановку реакции нейтрализации проводят на ХАО 12-дневных КЭ. Для постановки реакции используют подготовленные КЭ (раздел «Специфическая безопасность») и в качестве вируса стандартный образец активности специфичности и некротической активности оспенной вакцины. Определяют рабочее разведение вируса титрованием на ХАО 12-дневных КЭ. Для этого готовят ряд последовательных десятикратных разведений вируса на ФЦБ (в соответствии с инструкцией по применению стандартного образца активности, специфичности и некротической активности оспенной вакцины). Каждое разведение вируса в объёме 0,1 мл вводят на ХАО 6 КЭ. Инкубируют в термостате 48 ч при температуре (37 ± 1) °С. КЭ вскрывают, подсчитывают количество развившихся на ХАО оспин, рассчитывают среднее арифметическое значение оспин для каждого разведения. При постановке реакции нейтрализации используют то разведение стандартного образца, которое дает на ХАО куриных эмбрионов 40 – 60 оспин (рабочее

разведение). Готовят двукратные разведения исследуемых сывороток на ФЦБ растворе Мак-Ильвейна от 1:10 до 1:640 и разведения нормальной сыворотки 1:10 и 1:20 в объёме по 0,5 – 1 мл. К каждому разведению сыворотки добавляют равный объем вируса в рабочем разведении. При этом разведение сывороток увеличивается вдвое. Соответственно в смесях получают разведения исследуемых сывороток от 1:20 до 1:1280 и нормальной сыворотки 1:20 – 1:40. Смеси выдерживают при температуре (37 ± 1) °С в течение 2 ч. На ХАО КЭ наносят по 0,1 мл смеси, используя для каждой смеси по 5 – 6 эмбрионов. Инкубацию и вскрытие эмбрионов проводят так же, как при определении специфической безопасности.

Учет результатов. Подсчитывают количество развившихся на ХАО оспин и определяют их среднеарифметическое значение для каждого разведения сыворотки. Находят среднеарифметическое значение числа оспин, развившихся при исследовании 2 разведений нормальной сыворотки. Титром ВНА считают конечное разведение иммунной сыворотки, дающее нейтрализацию 50 % и более оспин от среднеарифметического числа, определенного в контроле с нормальной сывороткой. Допускается разброс вируснейтрализующих титров сывороток от 1:20 до 1:1280.

Пример расчета СГТ ВНА. При выявлении в реакции нейтрализации следующих титров ВНА в сыворотках 1:20, 1:80, 1:640, 1:640, 1:160, 1:160 для удобства расчета СГТ необходимо все значения привести к единому знаменателю (1:160 = 4:640, 1:80 = 8:640, 1:20 = 32:640), тогда:

$$\text{СГТ ВНА} = \sqrt[6]{\frac{32}{640}\cdot\frac{8}{640}\cdot\frac{1}{640}\cdot\frac{1}{640}\cdot\frac{4}{640}\cdot\frac{4}{640}} = \frac{\sqrt[6]{4096}}{\sqrt[6]{640^6}} = \frac{4}{640} = \frac{1}{160}.$$

Растворитель, выпускаемый в комплекте с препаратом

Растворитель – 0,9 % раствор натрия хлорида.

Описание. Прозрачная бесцветная жидкость.

Подлинность. Растворитель дает характерную реакцию на хлориды (образуется белый творожистый осадок). Определение проводят одновременно с количественным определением в соответствии с ОФС «Определение хлоридов методом обратного осадительного титрования в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Растворитель дает характерную реакцию на ионы натрия: 5 мл растворителя, упаренные до 1 мл, дают характерную реакцию на ионы натрия (окрашивание пламени в желтый цвет).

Прозрачность. Должен быть прозрачным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Цветность. Должен быть бесцветным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

pH. От 5,5 до 7,5. Испытания проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и в глазных лекарственных формах».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Бактериальные эндотоксины. Предельное содержание бактериальных эндотоксинов в растворителе должно быть не более 0,25 ЕЭ/мл. Определение проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

Стерильность. Должен быть стерильным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Стерильность», если в нормативной документации нет иных указаний.

Количественное определение. В 1 мл растворителя должно быть от 0,0087 до 0,0093 г натрия хлорида. Определение проводят в соответствии с

ОФС «Определение хлоридов методом обратного осадительного титрования в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С. Допускается однократное кратковременное (не более 24 ч) транспортирование при температуре от 9 до 20 °С.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Вакцина оспенная	**ФС.3.3.1.0035.15**
эмбриональная живая	**Взамен ФС 42-3110-95**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину оспенную эмбриональную живую, таблетки жевательные для орального применения. Вакцина представляет собой вирус вакцины, выращенный в хорионаллантоисной оболочке (ХАО) и плодике куриного эмбриона (КЭ), и высушенный со стабилизатором без консерванта. В таблетке содержится вируссодержащий материал и вспомогательные вещества, разрешенные к медицинскому применению.

Вакцина оспенная эмбриональная живая предназначена для профилактики натуральной оспы и заболеваний, вызываемых вирусами оспы животных, патогенными для человека.

ПРОИЗВОДСТВО

Все этапы производства вакцины должны осуществляться с соблюдением установленных требований к правилам организации производства и контролю качества лекарственного препарата, гарантирующих его качество и безопасность для человека.

Производство вакцины оспенной эмбриональной живой должно проводиться в отдельных изолированных помещениях, в которых не допускается производство других лекарственных средств. Условия производства должны соответствовать требованиям Санитарных правил «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Основные этапы производства:

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

- получение вируссодержащего материала путем введения посевного вируса на ХАО КЭ;
- инкубирование инфицированных эмбрионов, извлечение плодика и ХАО из эмбриона;
- гомогенизация материала;
- приготовление жидкой вакцины и добавление стабилизатора;
- лиофильная сушка материала;
- подготовка и расчет вспомогательных веществ для получения таблеток;
- прессование таблеток.

Характеристика материалов животного происхождения, используемых в производстве. В качестве продуцента для производства вакцины и посевного материала используют 12-суточные куриные эмбрионы пород «Леггорн», «Роменбраун», «Родонит», «Изобраун», «Русская белая», кросс 46, линия П4, П6. Яйца куриные инкубационные получают из птицехозяйств, свободных от вирусных и других заболеваний, патогенных для человека.

Требования к производственному штамму. Для производства вакцины оспенной эмбриональной живой используют штамм вируса осповакцины БИЭМГ (Б–51). Для приготовления вакцины используется посевной вирус первых 10 пассажей.

Штамм должен отвечать следующим требованиям:

– формировать на ХАО КЭ два вида (специфических образований) оспин: не менее 80 % белых плотных оспин размером 1 – 5 мм («белый» клон) и не более 20 % сероватых расплывчатых поверхностных оспин размером 1 – 3 мм («серый» клон);

– при культивировании на ХАО КЭ при температуре (37 ± 1) °С в течение (42 – 48) ч вирус вакцины должен накапливаться в концентрации 10^8 ООЕ/мл (ООЕ – оспообразующие единицы);

– не вызывать некроз кожи кроликов при внутрикожном введении в

дозе 10^4 ООЕ в 0,1 мл;

– не вызывать гибели кроликов при внутримозговом введении в дозе 10^6 ООЕ в 0,1 мл;

– быть безвредным (нетоксичным) для морских свинок и белых мышей в дозах соответственно $3 \cdot 10^7$ и $1{,}2 \cdot 10^6$ ООЕ/мл при подкожном введении.

Допустимое количество микроорганизмов в пересчете на 1 мл:

– общее число аэробных бактерий – не более 10^3;

– общее число грибов – не более 10^2;

– должны отсутствовать *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.

Производственный штамм контролируется на каждом пассажном уровне.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Таблетки жевательные круглые двояковыпуклые с риской и цельными краями диаметром 8 – 13 мм светло-коричневого цвета с запахом ванили. Определение проводят органолептически. По внешнему виду таблетки должны соответствовать требованиям ОФС «Таблетки».

Подлинность. Вакцина должна вызывать на хорионаллантоисных оболочках 12-суточных КЭ характерные специфические образования (оспины) 2 видов: не менее 80 % белых плотных оспин размером 1 – 5 мм («белый» клон), не более 20 % расплывчатых сероватых поверхностных оспин размером 1 – 3 мм («серый» клон). Контроль проводят одновременно с определением специфической активности (раздел «Специфическая активность»).

Средняя масса и отклонение от средней массы. От 0,2 до 1 г. Определение проводят в соответствии с ОФС «Таблетки».

Распадаемость. Должны распадаться в течение 1 ч. Определение проводят в соответствии с ОФС «Распадаемость таблеток и капсул».

Потеря в массе при высушивании. Не более 3,0 %. На 2 параллельных анализа используют не менее 7 таблеток. Определение проводят по ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Микробиологическая чистота. Допустимое количество в пересчете на 1 г таблеток:

– общее число аэробных бактерий – не более 10^3;

– общее число грибов – не более 10^2;

– должны отсутствовать *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.

Определение проводят по ОФС «Микробиологическая чистота». Масса исследуемых таблеток должна быть не менее 3 г. Таблетки в асептических условиях помещают в фарфоровую ступку с пестиком, растирают и суспендируют в 0,004 М стерильном фосфатно-цитратном буферном (ФЦБ) растворе Мак-Ильвейна в соотношении 1:10 (1 г в 10 мл).

Примечания.

1. Приготовление ФЦБ раствора Мак-Илвейна 0,004 М (pH 7,2 – 7,4). Готовят растворы 1 и 2.

Раствор 1: Лимонная кислота – 2,1 г; Вода очищенная – 100 мл.

Раствор 2: В мерной колбе вместимостью 1000 мл в воде очищенной растворяют 28,4 г натрия гидрофосфата безводного или 35,6 г натрия гидрофосфата дигидрата или 71, 6 г натрия гидрофосфата додекагидрата, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Смешивают 2 мл раствора 1 и 18 мл раствора 2 в мерной колбе вместимостью 1000 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Полученный раствор должен иметь pH 7,2 – 7,4. Если pH полученного раствора более 7,4, его доводят до нормы раствором 1. В случае, если pH полученного раствора меньше 7,2, приготовление раствора повторяют. Буферный раствор стерилизуют при температуре (120 ± 1) °С и давлении (0,1 ± 0,01) МПа в течение 8 – 30 мин (в зависимости от объема) или фильтруют через мембраны с диаметром пор 0,22 мкм и хранят при температуре от 2 до 8 °С. Срок хранения от 10 до 30 сут в зависимости от способа укупорки флаконов (способ укупорки флаконов должен быть указан в нормативной документации).

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичен для морских свинок массой 250 – 300 г и белых мышей массой 18 – 20 г при

подкожном введении 1 и 1/25 прививочной дозы соответственно. Испытания проводят по ОФС «Аномальная токсичность».

Для определения токсичности используют не менее 4 таблеток. Таблетки растирают в стерильной ступке и суспендируют в 0,9 % стерильном растворе натрия хлорида из расчета 5 мл на таблетку. После отстаивания в течение 45 – 60 мин вводят 5 мл надосадочной жидкости (по 2,5 мл в каждый бок) 2 морским свинкам и по 0,2 мл 5 беспородным белым мышам в холку. Наблюдение за животными проводят в течение 7 сут. В случае развития абсцесса или гибели хотя бы 1 животного производят повторный анализ на удвоенном количестве животных. Если при повторном анализе вновь регистрируются вышеперечисленные явления, серию препарата бракуют.

Специфическая активность. Одна прививочная доза препарата должна содержать не менее $1 \cdot 10^6$ и не более $3 \cdot 10^7$ ООЕ вируса вакцины.

Испытания проводят биологическим методом на ХАО 12-дневных КЭ от кур породы «Леггорн», «Роменбраун», «Родонит-2», «Изобраун» или «Хайсек», или пород кур, эмбрионы которых чувствительны к вирусу осповакцины. Объем выборки составляет не менее 7 прививочных доз (4 таблетки).

Куриные эмбрионы получают из хозяйств, свободных от вирусных и других возбудителей, патогенных для человека.

Подготовка КЭ. Проводят овоскопию КЭ в затемненном помещении. Каждый эмбрион просматривают в направленном пучке света. Свет должен падать сверху на тупой конец яйца. Яйцо с погибшим эмбрионом или с кровоизлиянием под оболочкой бракуют. В центре воздушного мешка на тупом конце яйца и на боковой поверхности яйца, на участке между сосудами и их ответвлениями карандашом делают отметку. В местах отметок с соблюдением правил асептики пропиливают бормашиной с абразивным диском отверстия (щели) длиной 3 – 4 мм и шириной 1,5 мм, не повреждая оболочки. Яйцо укладывают так, чтобы отверстие на боковой стороне было обращено вверх. Подскорлупную оболочку в центре воздушного мешка

прорывают плоской полукруглой хирургической иглой. Затем на отверстие, расположенное на боковой поверхности, вносят 0,1 мл стерильного 0,004 М раствора ФЦБ Мак-Илвейна, подогретого до температуры (50 ± 5) °С, и той же иглой осторожно продавливают подскорлупную оболочку. После этого практически вся капля раствора проходит под подскорлупную оболочку и частично отслаивает ХАО.

Из отверстия (в месте пропила) в центре воздушного мешка резиновой грушей осторожно отсасывают воздух до полного опускания ХАО. Яйца с опущенной ХАО помещают на лотки отверстием на боковой поверхности вверх и помещают в камеру с температурой (37 ± 1) °С. Через 2 ч проводят овоскопию и бракуют эмбрионы с кровоизлияниями и воздушными мешками под ХАО или без воздушных мешков.

Приготовление десятикратных разведений. Таблетки взвешивают с точностью до 0,001 г, растирают в фарфоровой ступке и добавляют стерильный ФЦБ из расчета 10 мл на 1 г таблеток (соотношение 1:10 – «исходное разведение пробы»). В полученной взвеси дают отстояться грубым частицам в течение 45 мин. Из надосадочной жидкости пробы готовят 2 параллельных ряда последовательных десятикратных разведений. С этой целью отбирают по 0,5 мл испытуемого образца и вносят в 2 пробирки, содержащие 4,5 мл стерильного ФЦБ, получают разведение 10^{-1}. Содержимое пробирок перемешивают с помощью пипеток не менее 30 раз. Из каждой пробирки с разведением 10^{-1} по 0,5 мл разведенного материала пипеткой переносят в последующую пробирку с 4,5 мл ФЦБ, не касаясь жидкости пипеткой, получают разведение 10^{-2}, и т.д. до разведения 10^{-5}, меняя пипетки после каждого разведения.

Примечание.

В используемый ФЦБ (раздел «Микробиологическая чистота») добавляют бензилпенициллин калия или натрия и стрептомицина сульфат из расчета 250 ед. активности каждого антибиотика в 1 мл ФЦБ.

Инфицирование КЭ. Для инфицирования КЭ используют разведения вакцины 10^{-3}, 10^{-4} и 10^{-5}, предварительно объединенные из 2 параллельных

рядов. Каждое разведение материала вводят на ХАО 15 КЭ по (0,10 ± 0,05) мл в отверстие на боковой поверхности яйца. Круговым вращением яйца вирус равномерно распределяют по ХАО. Инокулированные эмбрионы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 42 – 48 ч. По окончании инкубации КЭ вскрывают, изолируют ХАО, промывают её в воде, раскладывают на темном фоне и подсчитывают количество оспин на ХАО для каждого разведения. Из испытания исключают КЭ с поврежденной ХАО и погибшие.

Учет результатов. Вычисляют среднее арифметическое количество оспин на ХАО КЭ, инфицированных разведением вакцины, вызвавшим образование не менее 10 оспин (допускается расчет по максимальному разведению, содержащему не менее 80 % таких КЭ).

Расчет специфической активности (A) в ООЕ проводят по формуле:

$$A = 10 \cdot \frac{B}{C \cdot d \cdot e},$$

где: 10 – коэффициент исходного разведения пробы;

B – среднее арифметическое количество оспин на ХАО КЭ;

C – разведение исходной пробы;

d – объем инокулята, вводимого в КЭ;

e – количество таблеток (доз) в 1 г анализируемого образца.

Для определения чувствительности КЭ к вирусу вакцины параллельно с определением специфической активности на той же партии КЭ проводят определение специфической активности стандартного образца (СО) активности специфичности и некротической активности оспенной вакцины в соответствии с инструкцией по применению. На каждое разведение используют 15 КЭ.

Если полученная величина специфической активности СО отличается от указанной в паспорте, то вычисляют поправочный коэффициент ($K_п$) чувствительности данной партии КЭ к вирусу вакцины по формуле:

$$K_n = \frac{A_c}{A_1},$$

где: A_c – специфическая активность СО, указанная в паспорте, ООЕ/мл;

A_1 – полученная специфическая активность СО, ООЕ/мл.

Результаты определения специфической активности испытуемой серии препарата умножают на поправочный коэффициент $K_п$.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Вакцина паротитная культуральная живая	**ФС.3.3.1.0036.15** **Взамен ФС 42-3251-95**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину паротитную культуральную живую (лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения), представляющую собой препарат, содержащий аттенуированный вакцинный штамм вируса паротита Ленинград-3 (Л-3), выращенный на первичной культуре фибробластов эмбрионов перепелов (ФЭП).

Вакцина предназначена для плановой и экстренной профилактики эпидемического паротита.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство вакцины паротитной культуральной живой должно осуществляться с соблюдением установленных требований к правилам надлежащей организации производства и контроля качества лекарственных препаратов на всех этапах производства, в основе которого заложена система посевных вирусов.

В качестве субстрата для накопления вируса используют первичную культуру ФЭП.

Производство вакцины должно обеспечивать стабильность показателей качества готового продукта.

Качество исходного сырья и материалов, используемых в производстве, должно быть подтверждено соответствующими документами.

Состав вакцины. Одна прививочная доза препарата (0,5 мл) содержит:

Федеральная электронная медицинская библиотека

– активный компонент: вирус паротита – не менее 20 000 (4,3 lg) тканевых цитопатогенных доз ($ТЦД_{50}$);
– вспомогательные вещества: стабилизатор, состав и количество которого указывают в нормативной документации.
– антибиотик – гентамицина сульфат – не более 20 мкг, если нет других указаний в нормативной документации.

Производственный штамм

Производственный штамм – вируссодержащая жидкость, приготовленная путем пассирования вакцинного штамма вируса паротита в производственном клеточном субстрате. Производственный штамм должен быть идентифицирован с помощью документов, которые должны включать сведения о происхождении штамма, методе аттенуации и уровне пассажа, на котором аттенуация была подтверждена результатами клинических испытаний. С помощью соответствующих лабораторных методов и клинических испытаний на восприимчивых к эпидемическому паротиту людях должно быть доказано, что штамм вируса эпидемического паротита, используемый в производстве вакцины, безопасен и иммуногенен.

Производственный штамм вируса паротита, приготовленный из вакцинного штамма Л-3, депонирован в официальной Государственной коллекции вирусов.

Производственный штамм должен отвечать следующим требованиям:
– быть специфичным;
– обладать генетической стабильностью;
– иметь специфическую активность не ниже 3,5 $lgТЦД_{50}$/0,5 мл;
– быть стерильным: не содержать бактерий, грибов, микоплазм, микобактерий туберкулеза и посторонних вирусов;
– должен обладать репродуктивной активностью: вызывать специфическую дегенерацию в чувствительных культурах клеток, сопровождающуюся накоплением вируса в питательной среде;

– не обладать аномальной токсичностью;

–не обладать остаточной нейровирулентностью при интрацеребральном введении обезьянам;

– не быть контагиозным;

– потеря в массе при высушивании должна быть не более 2,0 %;

– должен сохраняться в лиофилизированном виде при температуре минус (60±10) °С.

По указанным показателям должна быть проверена каждая новая серия производственного штамма.

Производственный штамм в процессе хранения должен быть проверен на генетическую стабильность (не реже 1 раза в 5 лет).

Примечание.

Испытание производственного штамма, посевного вируса, клеточной культуры, сыворотки крупного рогатого скота на присутствие микоплазм должно проводиться двумя методами: цитохимическим и микробиологическим. Испытание на присутствие микоплазм в вирусных сборах, нерасфасованной вакцине и в готовом продукте следует проводить микробиологическим методом.

Посевной вирус

Посевной вирус – вируссодержащая жидкость, полученная путем однократного пассирования промежуточного пассажа производственного штамма на производственном субстрате; служит в качестве посевного материала для изготовления вакцины. Посевной вирус должен обладать теми же характеристиками, что и штамм, из которого он получен. Каждая серия посевного вируса должна быть идентифицирована как вирус эпидемического паротита с помощью соответствующих методов.

Каждая серия посевного вируса должна быть проверена на остаточную нейровирулентность, что определяют в тесте на обезьянах по ОФС «Оценка специфической безопасности производственных штаммов и посевных вирусов кори, паротита и краснухи».

Требования к специфической безопасности вакцины касаются не только отсутствия остаточной нейровирулентности, но также и наличия генетической стабильности производственного штамма и посевных серий. Следует оценивать генетическую стабильность новых посевных серий вируса паротита так же, как и новых серий производственного штамма. Сравнительный анализ секвенированных последовательностей генома вируса в указанных производственных материалах должен подтвердить их идентичность структуре вакцинного штамма.

Методы культивирования должны обеспечивать сохранение иммуногенных свойств готового препарата, его безопасность и предотвращать контаминацию посторонними вирусами, бактериями, грибами и микоплазмами.

Пассажный уровень вируса в готовом препарате должен быть ограничен. Допускается пассирование производственного штамма и посевных вирусов в культуре ФЭП с таким расчетом, чтобы готовая вакцина содержала вирус, прошедший не более 10 пассажей от вакцинного штамма.

Особое внимание уделяют обеспечению стабильности таких параметров, как множественность заражения и условия культивирования (продолжительность и температура инкубации).

Рекомендуется хранить большой объем серии посевного вируса в качестве основного материала, который изготовитель должен использовать для производства коммерческих серий вакцины. Серии посевного вируса в лиофилизированном виде следует хранить при температуре ниже минус 20 °С, а в нелиофилизированном виде – при температуре ниже минус 60 °С.

Клеточный субстрат, используемый для производства

Субстратом для размножения и накопления вируса паротита является первичная культура ФЭП. Оплодотворенное перепелиное яйцо должно быть получено от птиц, которые содержатся в изолированных специализированных хозяйствах, свободных от вирусов лейкоза птиц и других микроорганизмов, патогенных для птиц. Птиц в этих хозяйствах

постоянно контролируют на отсутствие аденовируса птиц 1-ой, 3-ей и 4-ой групп, энцефаломиелита птиц, гриппа птиц типа А, парамиксовируса, реовируса, пневмовируса, оспы и туберкулеза птиц, вируса анемии цыплят, инфекционного бронхита, бурсита и ларинготрахеита, лейкоза и микоплазмоза птиц, вирусов лимфоидного лейкоза, болезни Марека и Ньюкастла, гемофильной инфекции, сальмонеллеза, пастереллеза, орнитоза и др. инфекционных заболеваний птиц.

При культивировании клеток не допускается использование нативной сыворотки крови человека.

Питательная среда для клеток может содержать pH индикатор, например, феноловый красный, а также разрешенные антибиотики в минимальной эффективной концентрации. Не допускается использование пенициллина и стрептомицина.

Материалы от животных, которые используют при производстве вакцины, получают из хозяйств, благополучных в отношении бактериальных, вирусных, прионовых и других заболеваний, опасных для человека. Сыворотка крови крупного рогатого скота должна быть получена от животных из стада, в котором отсутствуют такие заболевания, как спонгиформная энцефалопатия и лейкоз крупного рогатого скота. Трипсин, используемый для приготовления клеточной культуры, не должен содержать микоплазм, цирко- и парвовирусов свиней, а также должен быть испытан на отсутствие контаминации бактериями и грибами.

Вещества, вносимые в препарат

К веществам, вносимым в препарат, относят сыворотку крови крупного рогатого скота, которая используется для выращивания клеточной культуры. Сыворотка должна быть испытана на отсутствие контаминации вирусами, бактериями, грибами, микоплазмами.

Сыворотка крови животных должна быть удалена после инокуляции культуры клеток посевным вирусом. Перед сбором вируса культуру клеток отмывают, и ростовую среду заменяют бессывороточной поддерживающей

средой. Наличие остаточного количества бычьего сывороточного альбумина (БСА) не должно превышать 50 нг в одной прививочной дозе (0,5 мл). Определение проводят иммунохимическим методом на образце готовой серии.

Испытания на этапах производства

В процессе производства проводят исследование на присутствие контаминантов в культуральной жидкости, собранной с культур контрольных клеток, в образцах индивидуальных вирусных сборов и в образцах объединенных вирусных сборов. Индивидуальные вирусные сборы контролируют на стерильность и специфическую активность. Объединенные вирусные сборы контролируют на стерильность, присутствие микоплазм, микобактерий, посторонних вирусов, содержание белка, интактных клеток, специфическую активность. В готовой жидкой нерасфасованной вакцине проверяют специфическую активность, стерильность, присутствие микоплазм.

При производстве вакцины особое значение имеет постоянное выполнение на всех этапах производства внутрипроизводственного анализа основных показателей качества и анализа качества готовой продукции при выпуске.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Лиофилизат – однородная пористая масса. Цвет лиофилизата указывают в нормативной документации. Определение проводят визуально.

Восстановленный препарат – прозрачная жидкость. Цветность восстановленного препарата указывают в нормативной документации. Определение проводят визуально.

Подлинность. Должен содержать вирус паротита. Определяют в реакции нейтрализации на культуре клеток *Vero*. Подлинность вируса паротита в вакцине устанавливают на основании нейтрализации цитопатогенного действия (ЦПД) вируса паротита специфической иммунной

ФЭМБ Федеральный электронный медицинский библиотека

сывороткой, содержащей антитела к вирусу паротита. В реакции используют аттестованный стандартный образец паротитных антител.

Время растворения. Вакцина должна растворяться в течение 3 мин при внесении в ампулу 0,5 мл растворителя для вакцины на дозу. Определение проводят визуально.

Механические включения. Восстановленный препарат должен соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парэнтерального применения и в глазных лекарственных формах»

pH (восстановленного препарата)**.** От 7,2 до 7,8, если нет других указаний в нормативной документации. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС « Ионометрия».

Потеря в массе при высушивании. Не более 2,0 %. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Бычий сывороточный альбумин. Не более 50 нг в одной прививочной дозе. Определение проводят подходящим количественным иммунохимическим методом, указанным в нормативной документации.

Стерильность. Препарат не должен содержать бактерий и грибов. Определяют методом прямого посева или мембранной фильтрации с использованием тиогликолевой среды при двух температурных режимах в соответствии с ОФС «Стерильность».

Присутствие микоплазм. Препарат не должен содержать микоплазм**.** Определяют микробиологическим методом, в соответствии с ОФС «Испытание на присутствие микоплазм». Если при испытаниях на присутствие микоплазм сырья и материалов при входном контроле и на всех контрольных точках в технологическом процессе контаминация микоплазмами надлежащими методами не обнаружена, то испытание готовой серии препарата на присутствие микоплазм может не проводиться.

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичным.

Испытание проводят биологическим методом на белых мышах и на морских свинках обоего пола. Животным вводят по одной прививочной дозе препарата в объеме 0,5 мл внутрибрюшинно, если нет других указаний в нормативной документации.

Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

Специфическая активность. Прививочная доза (0,5 мл) должна содержать не менее 20000 (4,3 lg) $ТЦД_{50}$ вируса паротита. Титр вируса определяют в каждой из 5 ампул серии готового препарата по ЦПД вируса на культуре клеток *Vero*. Каждый образец вакцины должен иметь специфическую активность не ниже регламентированной, в противном случае проводят повторный контроль специфической активности дополнительных 5 образцов, результат которого считают окончательным. Минимально регламентированное содержание вируса в прививочной дозе должно сохраняться в течение всего срока годности.

Одновременно с определением титра вируса в образцах серии проводят титрование стандартного образца (СО) активности вируса паротита. Одну ампулу стандартного образца титруют три раза для подтверждения достоверности каждого количественного определения активности.

Учет результатов проводят по ЦПД с помощью инвертированного микроскопа (увеличение: объектив 10× – окуляр 10×) в сроки, указанные в нормативной документации.

Наибольшее разведение вакцины, вызывающее ЦПД в 50 % лунок с зараженной клеточной культурой, принимают за титр вируса. Титр вируса в вакцине рассчитывают по методу Рида и Менча или Спирмена-Кербера.

При титровании вакцины в лунки планшетов вносят по 0,1 мл каждого разведения вакцины, т.е. объем, в 5 раз меньший, чем объем прививочной доза. Для расчета активности вируса в прививочной дозе к титру вируса, рассчитанному в lg $ТЦД_{50}$/0,1мл, добавляют постоянную величину, равную

lg 5, т.е. 0,7.

Критерии приемлемости результатов:

– диапазон доверительного интервала (P=0,95) среднего значения титра СО, определенного при трехкратном титровании 1 ампулы, должен быть в пределах ± 0,3 lg $ТЦД_{50}$;

— титр вируса в СО не должен отличаться более, чем на 0,5 lg $ТЦД_{50}$ от аттестационного значения.

Термостабильность. Препарат должен быть термостабильным. Испытание проводят, определяя специфическую активность при одновременном титровании 5 образцов вакцины, инкубированных при температуре (37 ± 1) °С в течение 7 сут и 5 образцов вакцины, хранившихся при температуре от 2 до 8 °С. Препарат считают прошедшим испытание, если средняя геометрическая величина титра вируса образцов после прогревания снижается не более, чем на 1 lg .

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Дополнительная информация: субстрат культивирования вируса и предупредительные надписи: «Хранить при температуре от 2 до 8 °С в недоступном для детей месте», «Избегать контакта вакцины с дезинфицирующими средствами».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С.

Федеральный электронный медицинский библиотека ФЭМБ

Вакцина полиомиелитная пероральная 1, 2, 3 типов, раствор для приема внутрь	**ФС.3.3.1.0037.15** **Взамен ФС 42-0022-00**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину полиомиелитную пероральную 1, 2, 3 типов, раствор для приема внутрь, предназначенную для профилактики полиомиелита.

Вакцина полиомиелитная пероральная типов 1, 2, 3, раствор для приема внутрь, представляет собой препарат из живых аттенуированных штаммов Сэйбина вируса полиомиелита: тип 1 (LSc 2ab), тип 2 (P712 Ch 2ab), тип 3 (Leon 12 a_1b), выращенных на первичной культуре клеток почек африканских зеленых мартышек (КПЗМ) или на первичной культуре КПЗМ с одним пассажем на перевиваемой культуре клеток линии *Vero*. Вакцина может содержать 1 тип или любую комбинацию из 3 типов штаммов вируса Сэйбина и выпускаться в лекарственной форме, пригодной для приема внутрь.

Препарат предназначен для профилактики полиомиелита.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство основано на системе посевных серий вируса пероральной полиомиелитной вакцины и клеточных линий для размножения и определения активности вируса полиомиелита. Все этапы производства вакцины должны осуществляться с соблюдением установленных требований правил организации производства и контроля качества лекарственного препарата, гарантирующих качество и безопасность для человека.

Федеральный электронный медицинский фонд библиотека

Состав

Действующие вещества (количество инфекционных единиц (ИЕ) вируса, выраженное в тканевых цитопатогенных дозах ($ТЦД_{50}$)) - вирус полиомиелита, аттенуированные штаммы Сэйбина:

- тип 1 – не менее $10^{6,0}ТЦД_{50}$;
- тип 2 – не менее $10^{5,0}ТЦД_{50}$;
- тип 3 – не менее $10^{5,5}ТЦД_{50}$.

Вспомогательные вещества:

- магния хлорид – стабилизатор;
- канамицин – антибиотик в качестве консерванта;
- гидролизат лактальбумина в растворе Эрла (pH 7,5) – среда.

Производственные штаммы

Используются производственные штаммы Сэйбина вируса полиомиелита: тип 1-LSc 2ab, тип 2 – P 712 ch 2ab, тип 3 – Leon 12 a_1b. Рабочие посевные серии вируса полиомиелита используют для производства вакцины на первичной культуре КПЗМ или на первичной культуре КПЗМ с 1 пассажем на перевиваемой культуре клеток линии *Vero*. Рабочие посевные серии готовят из основных посевных вирусов с использованием не более 3 пассажей для вирусов типов 1, 2 и не более 2 пассажей для вируса типа 3. Основные (прототипные) штаммы предоставляются ВОЗ.

Основные и рабочие посевные серии должны быть стерильны, иметь титр не менее 10^7 ИЕ в 1 мл, быть типоспецифичны, иметь характеристику по генетическому маркеру rct/40, соответствующую аттенуированным штаммам, авирулентны.

Рабочие посевные вирусы должны проходить испытания на соответствие требованиям не реже, чем 1 раз в год по основным показателям: стерильность, специфическая активность, генетический признак rct/40.

Вакцина может выпускаться в виде монопрепаратов (тип 1; тип 2; тип 3). Требования, предъявляемые к моновакцине аналогичны требованиям к

вакцине полиомиелитной пероральной 1, 2, 3 типов, изложенным в настоящей фармакопейной статье.

Стандартные образцы. В качестве стандартных образцов для количественного определения вируса полиомиелита типов 1, 2, 3 используют стандартные образцы производства, аттестованные в соответствии со стандартами ВОЗ соответствующих типов. Стандартный образец должен использоваться в каждом испытании.

Субстрат для культивирования вируса. Субстратом для производства полиомиелитной вакцины являются клетки почек обезьян (*Cercopithecus aethiops* и др.). Животных, используемых для получения клеточной суспензии, получают из питомников, где они содержатся в карантинных группах в течение 6 недель перед использованием. Животных осматривают на наличие герпетических поражений, конъюнктивита, проверяют на отсутствие туберкулезной инфекции, цитомегаловирусов, ретровирусов и др. Сыворотки обезьян исследуются на отсутствие антител к вакуолизирующему вирусу обезьяны 40 (SV_{40}), к вирусу иммунодефицита обезьян и к спумавирусам. Взятие почек осуществляют, соблюдая требования асептики, материал подвергают трипсинизации методом измельчения или перфузии. Далее клетки суспендируют в питательной среде ГЛАХИ с добавлением 10 % сыворотки крупного рогатого скота (СКРС), предварительно проверенной на отсутствие посторонних вирусов и антител к вирусу SV_{40}.

Клеточную взвесь контролируют на стерильность и разливают во флаконы. Культуру клеток инкубируют при температуре (35 ± 1) °С в течение 6 сут.

При использовании в качестве субстрата перевиваемой культуры клеток линии *Vero* создают рабочий банк клеток. Из ВОЗ получают посевной банк клеток линии *Vero* (*Vero* WHO) на уровне 134 пассажа. Рабочий банк клеток используют на уровне 139 – 140 пассажей. Посевной и рабочий банки клеток должны быть охарактеризованы в соответствии с требованиями, предъявляемыми к клеточным банкам, и храниться при температуре минус

196 °С. Размораживание и дальнейшее культивирование клеточной культуры проводится в питательной среде с добавлением СКРС.

Перед заражением производственных культур КПЗМ на отсутствие посторонних вирусов контролируют культуральную жидкость – в культурах почечных клеток обезьян и кроликов и диплоидных клеток человека; незараженные культуры – с пассажем в культуры почечных клеток обезьян и кроликов.

Перед заражением производственной культуры клеток линии *Vero* на отсутствие посторонних вирусов контролируют культуральную жидкость – в культуре клеток линии *Vero*, в культурах почечных клеток кроликов и диплоидных клеток человека; незараженные культуры – с пассажем в культуру клеток 4647 и в культуру клеток почек кролика. Монослой клеточной культуры, предназначенный для заражения штаммом вируса полиомиелита, не должен иметь признаков спонтанной дегенерации. Партии культур-продуцентов линии *Vero* контролируют на видовую идентичность клеткам рабочего банка *Vero*.

Вирусный посевной материал. Производство полиомиелитной пероральной вакцины основано на системе посевных вирусов.

Основные (прототипные) посевные вирусы, изготовленные из оригинальных аттенуированных штаммов вируса полиомиелита типа 1, 2 и 3, предоставляются ВОЗ.

Рабочие посевные вирусы полиомиелита (тип 1; тип 2; тип 3) готовят из прототипного посевного вируса в первичной культуре КПЗМ с использованием не более 3 пассажей для полиовирусов типа 1 и 2 и не более 2 пассажей для вируса типа 3.

При изготовлении рабочего посевного вируса необходимо определить его титр, идентифицировать как вирус данного типа с помощью нейтрализации вируса в культуре клеток при использовании специфических антител и контролировать:

– отсутствие посторонних вирусов в культуре клеток почек обезьян и кроликов, и в культуре диплоидных клеток человека;

– стерильность;

– отсутствие микоплазмы;

– отсутствие агентов, патогенных для кроликов;

– нейровирулентность на обезьянах;

– генетическую стабильность (rct/40 – признак).

Контроль на нейровирулентность для обезьян. Рабочий посевной вирус должен выдержать испытание на нейровирулентность. Контроль проводят на клинически здоровых обезьянах путем введения испытуемого материала в спинной или головной мозг. Испытание проводят на обезьянах рода *Macaca* или *Cercopithecus* массой не менее 1,5 кг. Сыворотки, взятые у обезьян перед заражением, не должны содержать в разведении 1:4 нейтрализующих антител к 3 типам вируса полиомиелита. Количество вируса типов 1, 2, 3, взятого для реакции нейтрализации, не должно превышать 1000 ИЕ.

После окончания периода клинического наблюдения всех выживших животных тотально обескровливают под глубоким наркозом.

Заражение обезьян в головной мозг. При введении испытуемого материала в область зрительных бугров головного мозга содержание вируса типов 1, 2, 3 должно быть не менее $10^{7,0}$ БОЕ или $ТЦД_{50}$ в 1 мл.

Обезьян (по 10 в каждой группе) под наркозом заражают неразведенной и разведенной 1:10 вирусной суспензией, для чего используют иглу диаметром 0,6 мм и длиной 2,3 – 2,5 см. Испытуемый материал инокулируют в область зрительных бугров правого и левого полушария по (0,5 ± 0,01) мл в каждый. Для этого иглу вводят под острым углом в трепанационные отверстия, проделанные на коронарном шве, отступив 4 – 5 мм от точки его пересечения с сагиттальным швом.

Ежедневно в течение 28 сут оценивают состояние мышечного тонуса

конечностей зараженных животных. Изменения двигательной активности у зараженных обезьян, развивающиеся в первые 72 ч после инокуляции, относят к травматическим. Развивающаяся в последующие дни наблюдения неврологическая симптоматика относится к специфической.

Обезьян, выживших в течение 24 ч, но павших до окончания периода клинического наблюдения, подвергают аутопсии с дальнейшим гистологическим исследованием ЦНС для установления причины смерти. Животных, погибших по причинам, не связанным с полиомиелитом, исключают при учете результатов контроля.

Если у обезьян обнаруживают патологические изменения, характерные для полиомиелита, таких животных следует учитывать при обработке результатов опыта даже при отсутствии травматических изменений, связанных с введением иглы.

Требования. При интраталамическом способе заражения допускается испытание на остаточную нейровирулентность смеси 2 или 3 моновакцин одного типа при условии, что титр каждой моновакцины не менее $10^{7,5}$ $ТЦД_{50}$ в мл.

Если после введения смеси моновакцин хотя бы у 1 из обезьян были отмечены клинические проявления полиомиелита, подтвержденные гистологическим исследованием, осуществляют раздельное испытание каждой моновакцины, входившей в состав смеси. При появлении клинических признаков полиомиелита, подтвержденных гистологически хотя бы у 1 животного после введения монопрепарата, допускается повторное заражение обезьян соответствующими монопрепаратами. В случае появления клинических признаков полиомиелита при повторном заражении вакцина использованию не подлежит.

Для получения достоверных результатов в опыте должно быть учтено не менее 80 % животных.

Гистологическое исследование обезьян, зараженных в головной мозг. Тщательно выделенные головной и спинной мозг фиксируют целиком в 10 %

растворе формалина в течение 10 сут, затем промывают в проточной воде не менее 12 ч. Вырезку образцов ткани производят из следующих участков головного мозга: коры больших полушарий в области передней средней извилины, зрительных бугров, среднего мозга, мозжечка, продолговатого мозга на 2 уровнях. Из шейного отдела спинного мозга вырезают образцы из 1 – 6 сегментов, из поясничного отдела – из 2 – 5 сегментов.

Полученные образцы маркируют и последовательно обрабатывают этиловым спиртом повышающейся концентрации (70 , 80 %) по 10 ч, дважды 96 %, дважды абсолютным спиртом (по 10 и 12 ч), смесью абсолютного спирта и хлороформа (1:2) 1,5 – 2 ч, дважды хлороформом по 30 мин и смесью хлороформа и парафина (1:1) в течение 4 ч при температуре (37 ± 1) ºС. После этого материал выдерживают в парафине 3 раза по 60 мин и заливают смесью парафина и воска в соотношении 10:1. Резку блоков проводят на микротоме. Толщина срезов от 5 до 8 мкм.

Оценку безопасности препарата проводят на основании микроскопического изучения наличия специфических для полиомиелита патоморфологических изменений (ПМИ), их тяжести и распространенности в каждом исследуемом участке головного и спинного мозга. Срезы окрашивают галлоционином или по методу Ниссля.

При интрацеребральном способе заражения оценку проводят по четырехбалльной системе:

0 – отсутствие морфологических изменений;

+ – гибель единичных нервных клеток, единичные (1 – 2) васкулиты и мелкие очаги лимфогистиоцитарной инфильтрации в сером веществе спинного мозга; повреждение 1 ядра головного мозга или единичный очаг поражения в двигательной зоне коры; очаговая инфильтрация лимфогистиоцитарными элементами мягких мозговых оболочек, стромы сосудистых сплетений, субэпендимарные зоны желудочков;

++ – гибель до 40 % нервных клеток, развитие 3 и более васкулитов и

очагов лимфогистиоцитарной инфильтрации в сером веществе спинного мозга; повреждение 2 – 3 ядер головного мозга или 2 – 3 очага поражения в двигательной зоне коры;

+++ – гибель от 40 до 90 % нервных клеток, множественные васкулиты, крупноочаговая или диффузная лимфогистиоцитарная инфильтрация серого вещества спинного мозга; поражение более 3 ядер головного мозга или более 3 очагов поражения в двигательной коре;

++++ – субтотальная и тотальная гибель нервных клеток в различных отделах спинного и головного мозга.

Исследованная объединенная вирусная суспензия (моновакцина) и полиомиелитная вакцина, содержащая все 3 серотипа вирусов, считается прошедшей испытания, если:

– ни в одном из отделов головного мозга не обнаружены изменения на ++++ балла;

– изменения на +++ отмечаются только в месте введения и в других отделах головного мозга, но не более чем у 2 обезьян;

– изменения на ++ в спинном мозге отмечаются не более чем у одной трети обезьян.

Если отмеченные изменения превышают вышеуказанные пределы, то возможно проведение повторного контроля. При развитии в повторном опыте характерных для полиомиелита изменений, превышающих вышеприведенные пределы, вакцина использованию не подлежит.

Заражение обезьян в спинной мозг. Испытуемый материал и соответствующий гомотипичный международный эталонный препарат вводят обезьянам в поясничный отдел спинного мозга. При этом концентрации вирусной суспензии в обоих препаратах должны быть максимально равнозначными и составлять от $10^{5,5}$ до $10^{6,5}$ $ТЦД_{50}$ в 0,1 мл.

Для заражения используют иглу диаметром 0,3 мм, длиной 2,5 см с коротким срезом. Объем введенного материала в поясничное утолщение

спинного мозга составляет 0,1 мл. Необходимо заразить такое число обезьян, чтобы при проверке вирусов типа 1 и 2 в группах, получивших испытуемую вакцину и эталонный препарат, было не менее 11 «положительных» животных («положительной» считается обезьяна, у которой в центральной нервной системе выявлены характерные для полиовируса поражения нейронов). При проверке вируса типа 3 должно быть не менее 18 обезьян с положительной реакцией на эталонный препарат и еще столько же – на испытуемую вакцину. Для того чтобы иметь 11 и 18 «положительных» обезьян, обычно вводят препараты 12 и 20 животным соответственно. Если проверка проводится в течение 2 рабочих дней, то вакцину и гомотипичный эталонный препарат следует вводить в каждый из дней равному числу животных.

Место инокуляции определяют 2 способами:

1. Проводят воображаемую линию, соединяющую левый и правый гребни подвздошной кости. От места пересечения этой линии с позвоночником отсчитывают 4 остистых отростка тел позвонков по направлению к голове. Введение вирусной суспензии осуществляют в межпозвоночное пространство над 4 остистым отростком, соответствующее межпозвоночному промежутку между 1 и 2 поясничными позвонками.

2. Проводят воображаемую линию, соединяющую свободные концы двенадцатых ребер слева и справа. Иглу вводят в место пересечения этой линии с позвоночником. Эта точка должна совпадать с точкой, найденной первым способом.

Обезьяну укладывают на столе лицевым диском вниз. Иглу вводят в найденное межпозвоночное пространство перпендикулярно к позвоночнику, отступив 1 мм от его средней линии, и продвигают ее до тех пор, пока не возникнет резкое сокращение группы мышц одной или обеих нижних конечностей, что свидетельствует о прохождении острия иглы через твердую мозговую оболочку. Затем иглу продвигают вглубь мозга еще на 2 – 3 мм, после чего медленно вводят материал. Правильное введение испытуемого

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

материала сопровождается фибриллярными сокращениями мышц одной или обеих конечностей. Если вторичного моторного ответа (фибрилляция мышц) не наблюдается, иглу извлекают и введение повторяют еще раз.

После окончания инокуляции иглу проводят до вентральной стенки позвоночного канала и извлекают.

Наблюдение за обезьянами проводится в течение 17 – 22 сут с выявлением симптомов, характерных для полиомиелита: мышечная слабость, парезы, параличи конечностей. Появление двигательных изменений в первые 72 ч после интраспинальной инокуляции относят к травматическим. Развитие неврологической симптоматики в последующие сроки следует относить к специфической и оценивать по четырехбалльной системе:

1 – мышечная слабость, 2 – легкий парез, 3 – парез средней тяжести, 4 – паралич.

Результаты испытания учитывают в случае, если не менее 80 % животных каждой группы остаются живыми в течение периода наблюдения.

Гистологическое исследование ЦНС обезьян, зараженных в спинной мозг. Всех выживших обезьян подвергают аутопсии с извлечением головного и спинного мозга.

Гистологическому исследованию подвергаются, как минимум, поясничный и шейный отделы спинного мозга, нижняя и верхняя части продолговатого мозга, мост, мозжечок, средний мозг, таламус и моторная часть коры головного мозга каждой обезьяны. Метод получения гистологических срезов соответствует описанному выше при введении вирусной суспензии в головной мозг. Срезы окрашивают галлоцианином. Допускается исследование срезов толщиной 8 – 15 мкм, окрашенных по методу Ниссля.

Исследуются следующие срезы:

– 12 срезов, сделанных на протяжении всего поясничного отдела спинного мозга;

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

– 10 срезов, сделанных на протяжении всего шейного отдела спинного мозга;

– 2 среза продолговатого мозга;

– 1 срез моста и мозжечка;

– 1 срез среднего мозга;

– по 1 срезу правой и левой частей таламуса и участков коры головного мозга.

Оценку нейровирулентной активности вируса проводят в полусферах спинного мозга и ствола мозга. Повреждения оцениваются следующим образом:

1. Клеточная инфильтрация без поражения нейронов.

2. Клеточная инфильтрация с минимальным поражением нейронов.

3. Клеточная инфильтрация с обширным поражением нейронов.

4. Массивное поражение нейронов с клеточной инфильтрацией или без нее.

Степень повреждений регистрируют в протоколе стандартной формы.

Реакция считается положительной, если на срезах обнаруживается поражение нейронов, но отсутствует след от введения иглы.

Реакция считается отрицательной, если на срезах есть след от введения иглы, но отсутствует поражение нейронов.

При учете результатов исключают срезы, в которых имеются поражения, обусловленные травмой, но отсутствуют специфические вирусные поражения.

Объединенная вирусная суспензия (моновакцина) считается прошедшей контроль, если требуемое количество животных дает положительную реакцию и клинические и гистологические данные свидетельствуют об отсутствии статистически достоверного различия между патогенностью вакцинного вируса и эталонного препарата.

Генетическая стабильность (rct/40 – признак). Объединенную

вирусную суспензию (моновакцину) проверяют в тесте *in vitro* на способность к размножению вируса в КПМЗ при 2 температурных режимах 34 и 40 ºС в сравнении с гомологичным контрольным вирусом rct/40 – (стандартный образец) и гомологичным контрольным вирусом rct/40 + вирулентный штамм.

Объединенную вирусную суспензию считают прошедшей испытания, если ее титр и титр стандартного образца (СО) при температуре 40 °С снижен по сравнению с титром при температуре 34 ºС не менее чем в 100000 раз. При этом титр контрольного вируса rct/40 + вакцинального штамма гомологичного типа при указанных выше 2 температурах не должен изменяться.

При получении разового сбора вируссодержащей жидкости (суспензия одного типа вируса, собранная с культур клеток, выращенных за 1 производственный цикл) проводят испытания, указанные при описании как клеток-продуцентов КПЗМ, так и клеточной линии *Vero*.

При получении объединенной суспензии (смесь нескольких разовых сборов вируса одного типа) до и после фильтрации определяется титр вируса и проводятся контроли на:

– стерильность;

– отсутствие микоплазмы;

– отсутствие агентов, патогенных для кроликов;

– типоспецифичность;

– нейровирулентность на обезьянах;

– генетическую стабильность (rct/40 – признак).

Объединенную суспензию (моновалентная вакцина) стабилизируют магния хлоридом, проверяют на стерильность по содержанию бактерий и грибов и определяют ее специфическую активность.

При получении готовой вакцинной массы (суспензия, состоящая из объединенной суспензии каждого типа вируса полиомиелита) и ее розливе

необходимо провести контроль на контаминацию бактериями и грибами до и после розлива.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачная жидкость от желтовато-красного до розово-малинового цвета без осадка и без видимых посторонних включений. Метод определения визуальный.

Подлинность. Вакцина должна быть типоспецифичной и содержать аттенуированные штаммы Сэйбина тип 1, тип 2, тип 3. Определение проводят в реакции нейтрализации цитопатогенной активности вакцинных штаммов соответствующими диагностическими сыворотками к вирусам полиомиелита всех 3 серотипов в культуре клеток *Hep-2* Цинциннати параллельно со СО как моно, так и трехвалентного препарата тест-вакцины. Определение проводят по методике, описанной в разделе «Специфическая активность». Титр вакцины в присутствии смеси гомотипичных диагностических энтеровирусных сывороток должен быть снижен не менее чем на 2 lg (т.е., не менее чем в 100 раз).

Прозрачность. Вакцина должна быть прозрачной. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Цветность. Вакцина должна быть от желтовато-красного до розово-малинового цвета. Метод определения визуальный. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкости».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

pH. От 6,8 до 7,2. Метод определения потенциометрический. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Стерильность. Вакцина должна быть стерильной и не содержать посторонних микроорганизмов – бактерий, в том числе микоплазм и грибов. Стерильность определяют методом прямого посева или мембранной

фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность».

Специфическая активность. Вакцина полиомиелитная пероральная типов 1, 2, 3 должна содержать в 1 прививочной дозе (0,2 мл) инфекционных единиц (ИЕ) вируса ($ТЦД_{50}$) не менее: тип 1 – $10^{6,0}$; тип 2 – $10^{5,0}$; тип 3 – $10^{5,5}$. Определение специфической активности проводят на культуре клеток *Hep-2* (Цинциннати) по цитопатогенному действию (ЦПД) вируса в сравнении со СО трехвалентного препарата.

От каждой серии вакцины в опыте используют не менее трех флаконов, которые объединяют в один образец.

Исходные клетки *Hep-2* Цинциннати поддерживают многократным пассированием в питательной среде Игла МЕМ с добавлением 5 % сыворотки крови плодов коровы, содержащей гентамицина сульфат 40 мкг/мл.

При пассировании клеточных культур клетки снимают с поверхности стекла смесью растворов трипсина и Версена (1:1), подогретых до температуры 37 °С, и засевают в количестве от 10^4 до $3 \cdot 10^4$ клеток на 1 $см^2$ площади одной из боковых сторон флакона и выращивают при температуре (37 ± 1) °С. Клеточный монослой формируется на 3 – 4 сут.

Титрование проводят в 96-луночных панелях для культивирования клеток фирмы Costar или других фирм аналогичного качества.

Содержание каждого типа вируса определяют в реакции нейтрализации путем нейтрализации 2 других типов вируса соответствующими им специфическими диагностическими энтеровирусными моновалентными сыворотками.

Рабочее разведение специфической сыворотки к каждому из 3 типов полиовакцины должно снижать титр вируса не менее чем на 2 lg (не менее чем в 100 раз). В каждое испытание наряду с исследуемым образцом включают одновременное титрование СО трехвалетной вакцины. Разведения вакцины и СО готовят на питательной среде Игла МЕМ, содержащей 2 %

сыворотки крови плодов коров кратностью 1×5. Диапазон разведений должен включать, по меньшей мере, 3 разведения препаратов, при которых вирус разрушает от 10 до 90 % зараженных клеток. В каждую лунку панели вносят по 0,1 мл смеси, содержащей 0,05 мл выбранных разведений вакцины или СО, и 0,05 мл смеси рабочих разведений нейтрализующих сывороток к 2 другим типам вируса (по 8 – 12 лунок на разведение), и инкубируют 3 ч при температуре (37 ± 1) °С. Затем во все лунки панелей при титровании трехвалентной вакцины добавляют по 0,1 мл взвеси клеток в концентрации 100000 – 200000 клеток в мл. В контрольные лунки вносят по 0,1 мл клеточной суспензии и 0,1 мл питательной среды. Панели инкубируют в термостате при температуре (37 ± 1) °С в газовой среде, содержащей 5 % CO_2, в течение 7 сут. Клетки *Hep-2* в лунках панели просматривают в инвертированном микроскопе на наличие цитопатогенного действия на 3, 5 и 7 дни инкубирования. $ТЦД_{50}$ /мл вируса рассчитывают на 7 день по методу Рида и Менча.

Так как разведения вируса, взятые в опыт по определению титра в тривакцине, разводятся в 2 раза смесью антисывороток, значение титра 10-дозовой вакцины (0,2 мл/доза) должен быть увеличен на 0,6 lg. Титрование каждой серии полиомиелитной вакцины проводят не менее 2, но не более 4 раз.

Учитывают результаты только тех титрований, в которых значение (десятичного) логарифма титра СО титруемого одновременно с вакциной, не должно отличается от значения титра СО, указанного в паспорте более чем на 0,5. Вычисляют среднюю арифметическую величину титра из результатов 2 титрований вакцины и делают заключение о соответствии или несоответствии вакцины требованиям, предъявляемым к специфической активности препарата. Повторные титрования забракованных серий вакцины не допускаются.

Термостабильность. Должна быть стабильна. Величина титра вируса после прогревания вакцины может снижаться не более чем на 0,5 lg. Не

менее 5 флаконов от каждой серии вакцины и СО прогревают при температуре (37 ± 1) °С в течение 48 ч, другие 5 флаконов препарата и СО (контроль) хранят при температуре, указанной в нормативной документации. Вакцины и СО в прогретых и контрольных образцах титруют одновременно по методике, изложенной в разделе «Специфическая активность». Повторное титрование не допускается (титр определяют в одном опыте).

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Предупредительные надписи: «Хранить в не доступном для детей месте», «Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений», «Для выращивания вируса используется питательная среда с гидролизатом лактальбумина (0,5 %) в растворе Эрла».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С. Допускается одноразовое повторное замораживание до температуры минус 20 °С.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади	**ФС.3.3.1.0038.15 Взамен ФС 42-412ВС-99**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади, который представляет собой белковую гамма-глобулиновую фракцию сыворотки крови лошади, обладающую активностью в отношении вируса бешенства. Препарат в комбинации с вакциной антирабической предназначен для профилактики бешенства по экстренным показаниям.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади должно осуществляться с соблюдением установленных требований правил организации производства и контроля качества лекарственного препарата, гарантирующих сохранение структуры и функции белков иммуноглобулина, обеспечивающих специфическую и вирусную безопасность препарата и исключающих контаминацию чужеродными агентами.

Иммуноглобулин из сыворотки крови лошади, раствор для инъекций, получают из плазмы крови лошадей, гипериммунизированных вирусом бешенства. Для иммунизации животных-продуцентов используют производственный штамм фиксированного вируса бешенства «Москва». Для получения очищенной концентрированной гамма-глобулиновой фракции плазмы лошади, содержащей противовирусные антитела, нейтрализующие вирус бешенства, применяют риванол-спиртовой метод.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади выпускают в комплекте с иммуноглобулином антирабическим разведенным 1:100, предназначенным для проведения внутрикожной пробы с целью выявления гиперчувствительности к белкам сыворотки крови лошади.

Производственный штамм вируса бешенства

Производственный штамм фиксированного вируса бешенства «Москва» должен соответствовать следующим требованиям:

Подлинность. Должен нейтрализоваться иммуноглобулином антирабическим из сыворотки крови лошади и не должен нейтрализоваться нормальной сывороткой крови крупного рогатого скота. Индекс нейтрализации должен быть не менее 100.

Для испытания параллельно готовят 2 ряда 10-кратных разведений вируса в диапазоне 1:5 до 1:50000. В качестве среды разведения используют 2 % раствор нормальной лошадиной сыворотки, приготовленный с применением стерильной воды очищенной или воды для инъекций. Сыворотку лошадиную нормальную предварительно инактивируют при температуре 56 °С в течение 30 мин. Для получения разведений в первую пробирку каждого ряда, соответствующую разведению 1:5, вносят 0,4 мл среды разведения, в остальные пробирки ряда – по 0,45 мл среды разведения. В первую пробирку каждого ряда добавляют по 0,1 мл восстановленной суспензии вируса бешенства штамм «Москва» и тщательно перемешивают содержимое пробирок. Далее готовят ряд последовательных разведений путем переноса 0,05 мл смеси из пробирки с готовым разведением в следующую в ряду пробирку, каждый раз используя новую пипетку (или наконечник автоматической пипетки). Из последней пробирки, соответствующей разведению 1:50000, удаляют 0,05 мл смеси в емкость с дезинфицирующим раствором. В результате конечный объем содержимого каждой пробирки составляет 0,45 мл смеси.

После приготовления разведений вируса в каждую пробирку первого ряда вносят по 0,45 мл иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади; в каждую пробирку второго ряда добавляют по 0,45 мл нормальной сыворотки крови крупного рогатого скота, инактивированной при температуре 56 °С в течение 30 мин.

В результате получают 2 ряда разведений вируса бешенства штамм «Москва» от 10^{-1} до 10^{-5} в комбинации со специфическими противовирусными антителами (первый ряд) или в смеси с нормальными антителами, не способными нейтрализовать вирус (второй ряд). Содержимое пробирок осторожно перемешивают путем встряхивания и инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (75 ± 15) мин. Затем пробирки охлаждают на льду до комнатной температуры и по 0,03 мл содержимого каждой пробирки вводят интрацеребрально 6 беспородным мышам массой 9 – 10 г. За животными наблюдают 14 дней. Мышей, погибших в течение первых 4 дней, при расчетах не учитывают. Титр вируса, использованного для заражения каждой из 2 групп мышей, вычисляют по методу Рида и Менча. Индекс нейтрализации рассчитывают путем вычитания логарифма обратного разведения, соответствующего LD_{50} вируса в смеси с иммуноглобулином антирабическим лошадиным, из логарифма обратного разведения, соответствующего LD_{50} вируса в смеси с нормальной сывороткой крупного рогатого скота. Если полученная разница превышает 2, то индекс нейтрализации больше 100.

Стерильность. Не должен содержать бактерий, в том числе микобактерий туберкулеза и грибов.

Испытание на отсутствие бактерий и грибов проводят в соответствии с ОФС «Стерильность». Испытание на отсутствие микобактерий туберкулеза проводят путем посева на среду Левенштейна-Йенсена.

Присутствие микоплазм. Не должен содержать микоплазм. Испытание проводят микробиологическим методом в соответствии с ОФС «Испытание на присутствие микоплазм».

Посторонние вирусные агенты. Не должен содержать посторонних вирусных агентов по результатам испытания на мышах-сосунках, беспородных белых мышах массой 15 – 20 г, морских свинках массой 350 – 500 г, культурах клеток.

Инфекционный титр вируса. Не менее 10^{-6} LD_{50}/мл при интрацеребральном заражении беспородных белых мышей массой 9 – 10 г и не более $10^{-1,5}$ LD_{50}/мл при внутримышечном и подкожном путях заражения; не менее $10^{-5,0}$ LD_{50}/0,2 мл при интрацеребральном заражении кроликов породы Шиншилла массой 2,5 – 3 кг.

При необходимости проведения пассажа исходного производственного штамма для приготовления антигена для гипериммунизации животных-продуцентов допускается проведение не более 3 пассажей через мозг кролика.

Животные-продуценты

Для иммунизации используют клинически здоровых лошадей без различия пола. При отборе животных-продуцентов не допускается использовать лошадей, прошедших ранее курс гипериммунизации против любых вирусных инфекций. Для производства иммуноглобулина используют сыворотки лошадей с титром не ниже 1:500, определенных в реакции нейтрализации на белых мышах с разрешающей дозой вируса 100 – 500 LD_{50}/0,03мл.

Выделение балластных белков и получение осадка гамма-глобулина

Выделение балластных белков и получение осадка гамма-глобулина с целью его очистки и концентрирования проводят риванол-спиртовым методом.

Вспомогательные вещества

В состав препарата могут входить вспомогательные компоненты, разрешенные к медицинскому применению в дозах, не вызывающих

ФБУЗ ЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

токсические, аллергические или иные нежелательные реакции у человека. В качестве стабилизатора используют глицин.

Испытания промежуточных продуктов на производстве

Сыворотка, полученная от гипериммунизированных животных, должна иметь pH от 7,5 до 7,7. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Надосадочная жидкость после этапа выделения балластных белков проверяется на полноту осаждения риванола: риванол должен отсутствовать. Определение проводят методом флуоресценции.

Фильтрат для выделения гамма-глобулина – pH от 6,8 до 7,2. Определение проводят потенциометрически в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Жидкий иммуноглобулин испытывают на содержание белка (должно содержаться от 9 до 11 %). Определение проводят колориметрическим методом с биуретовым реактивом в соответствии с ОФС «Определение белка».

Этап розлива и запайки ампул. По показателю «Герметичность» испытывают все ампулы серии. Для проведения испытания ампулы помещают в кассеты, заполненные водой, подкрашенной любым красителем, растворимым в воде. Кассеты погружают таким образом, чтобы ампулы полностью находились в воде. Емкость с установленными в ней кассетами с испытуемыми ампулами герметично закрывают и создают в ней избыточное, по сравнению с атмосферным, давление (100 ± 20) кПа. Давление выдерживают в течение 20 – 25 мин, после чего устанавливают в емкости давление, равное атмосферному. Емкость открывают, кассеты с ампулами вынимают и просматривают на наличие в них подкрашенной воды. Ампулы, содержащие подкрашенную воду, считают не выдержавшими испытание.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачная или слабо опалесцирующая жидкость от

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

бесцветной до слабо-желтой окраски. Не допускается розовое окрашивание. Определяют визуально.

Подлинность. При испытании определяют следующие параметры подлинности препарата:

1. ***Видоспецифичность.*** Должен обладать видовой специфичностью, свойственной только белкам сыворотки крови лошади. Определение проводят методом кольцепреципитации с использованием коммерческих сывороток, преципитирующих белки сыворотки крови лошади, человека, крупного рогатого скота и свиньи.

Испытуемый образец разводят 0,9 % раствором натрия хлорида в соотношении 1:1000. В 4 стеклянные преципитационные пробирки высотой 6 – 10 мм вносят по 0,4 мл разведенного образца, затем на дно пробирок путем подслаивания под образец медленно вносят по 0,1 мл преципитирующей сыворотки: в первую пробирку – сыворотку, преципитирующую белки сыворотки крови лошади, во вторую пробирку – преципитирующую сыворотку к белкам сыворотки крови человека, в третью пробирку – сыворотку, преципитирующую белки сыворотки крови крупного рогатого скота, в четвертую пробирку – сыворотку, преципитирующую белки сыворотки крови свиньи. Учет результатов проводят визуально при дневном освещении на черном фоне при температуре (20 ± 4) °С немедленно после выполнения реакции и по истечении 1 ч. Образец считают выдержавшим испытание, если в первой пробирке (с гомологичной сывороткой) образуется кольцо преципитации в течение 1 – 10 мин, и если во второй, третьей, четвертой пробирках (с гетерологичными сыворотками) не образуется кольцо преципитации в течение 1 ч.

2. ***Специфичность антител.*** Должен содержать антитела к вирусу бешенства. Определение проводят в соответствии с разделом «Специфическая активность».

Прозрачность. Прозрачный или слегка опалесцирующий раствор с оптической плотностью не более 0,05. Определение проводят в соответствии

с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» в кюветах с толщиной слоя 3 мм при длине волны 540 нм по сравнению с водой очищенной. Метод определения указывают в нормативной документации.

Цветность. Бесцветный или светло-желтый раствор с оптической плотностью не более 0,15. Определение проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» в кюветах с толщиной слоя 3 мм при длине волны 400 нм по сравнению с водой очищенной. Метод определения указывают в нормативной документации.

pH. От 6,6 до 7,4. Испытуемый образец разводят до 1 % концентрации 0,9 % раствором натрия хлорида. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

Белок. От 9 до 11 %. Определение проводят колориметрическим методом с биуретовым реактивом в соответствии с ОФС «Определение белка».

Электрофоретическая однородность. Содержание фракции γ-глобулинов должно быть не менее 80 %; фракций α-, β-глобулинов – не более 20 %; альбумины должны отсутствовать. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение однородности сывороточных препаратов методом электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы».

Риванол. Должен отсутствовать. Должна отсутствовать характерная для риванола желто-зеленая флуоресценция.

Препарат визуально сравнивают со стандартным раствором, содержащим 0,2 мкг/мл риванола. Для испытания в одну кварцевую кювету толщиной слоя 10 мм вносят препарат иммуноглобулина, в другую –

стандартный раствор риванола, проводят измерение в ультрафиолетовом свете.

Примечания.

1. Приготовление основного раствора риванола 100 мкг/мл. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 5 мг риванола, растворяют в воде очищенной, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор хранению не подлежит.

2. Приготовление стандартного раствора риванола 0,2 мкг/мл. Перед определением основной раствор риванола разводят в 50 раз водой очищенной (до концентрации 2 мкг/мл). К 0,5 мл полученного раствора добавляют 4,5 мл воды очищенной и перемешивают. Используют свежеприготовленный раствор.

Спирт этиловый. Не более 4,5 %. Определение проводят методом, указанным в нормативной документации, в соответствии с требованиями ОФС «Определение спирта этилового в жидких фармацевтических препаратах».

Стерильность. Должен быть стерильным. Испытание на отсутствие бактерий и грибов проводят методом прямого посева или мембранной фильтрации с использованием тиогликолевой среды в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность. Должен быть апирогенным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Препарат вводят из расчета 1 мл на 1 кг массы тела кролика.

Аномальная токсичность. Должен быть нетоксичным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

Препарат вводят по 1 мл внутрибрюшинно 5 белым мышам массой 17 – 20 г, подкожно 2 морским свинкам массой 250 – 300 г – по 2,5 мл в каждый бок (если нет других указаний в нормативной документации). За животными наблюдают 7 дней.

Специфическая активность. Не менее 150 МЕ/мл. Испытание проводят биологическим методом на беспородных белых мышах или мышах линии Balb/c массой (11 ± 1) г.

Специфическую активность испытуемого образца определяют в сравнении со стандартным образцом специфической активности иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади, калиброванным по отношению к международному стандарту специфической активности иммуноглобулина антирабического.

Предварительно испытуемый и стандартный образцы разводят 0,9 % стерильным раствором натрия хлорида (если нет других указаний в нормативной документации) до получения конечного разведения (после добавления разрешающего разведения фиксированного вируса бешенства штамм «CVS») в соотношении 1:500; 1:1000; 1:2000; 1:4000 и т.д. в зависимости от предполагаемой специфической активности испытуемого образца. Разведения образцов для заражения животных указывают в нормативной документации. После этого в каждую пробирку с полученными разведениями добавляют разрешающее разведение вируса бешенства, содержащее от 100 до 500 LD_{50} , в объеме, равном объему испытуемого и стандартного образца. Содержимое пробирок перемешивают путем встряхивания. Расчет разрешающего разведения вируса бешенства для испытания проводят на основании результатов предварительного титрования вируса бешенства (определения инфекционной активности вируса).

Для определения точного количества доз вируса бешенства, взятого в опыт, одновременно с разведениями испытуемого образца готовят разведения вируса бешенства. Разрешающее разведение вируса бешенства смешивают с 2 % раствором нормальной лошадиной сыворотки, приготовленным с применением стерильной воды очищенной или воды для инъекций, в соотношении 1:1. Полученную смесь условно принимают за исходное разведение 10^0 и готовят последовательные десятикратные разведения вируса (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}) в 2 % растворе нормальной лошадиной

сыворотки. Сыворотку лошадиную нормальную предварительно инактивируют при температуре 56 °С в течение 30 мин.

Пробирки с разведениями испытуемого образца, стандартного образца и фиксированного вируса бешенства штамм «CVS» инкубируют при температуре 37 °С в течение (75 ± 15) мин или при температуре (6 ± 2) ° С в течение (18 ± 1) ч. Затем из каждого полученного разведения смеси вводят интрацеребрально лабораторным животным по 0,03 мл (не менее 10 мышей на каждое разведение испытуемого и стандартного образцов и не менее 10 мышей на каждое разведение фиксированного вируса бешенства штамм «CVS»). За мышами наблюдают в течение 14 сут. При оценке результатов опыта учитывают заболевших или павших животных с 5 по 14 сут.

После окончания опыта вычисляют точное количество вируса, содержавшееся в 0,03 мл разрешающего разведения, по методу Рида и Менча.

Расчет специфической активности антирабического иммуноглобулина производят по следующим формулам:

1) Определяют защитный титр ($КР_{50}$ – разведение, при котором выжило 50 % экспериментальных животных) испытуемого и стандартного образца:

$$T = A + \frac{50 - B}{C - B} \cdot Д,$$

где A – логарифм обратной величины разведения, при котором смертность животных ниже 50 %;

B – показатель смертности ниже 50 %;

C – показатель смертности выше 50 %;

$Д$ – логарифм кратности разведения.

$$КР_{50} = 10^{-T}$$

2) Специфическую активность испытуемого иммуноглобулина (СА) определяют в МЕ/мл относительно специфической активности стандартного образца по формуле:

$$CA = \frac{A}{B} \cdot n,$$

где A – обратная величина защитного титра испытуемого иммуноглобулина;

B – обратная величина защитного титра стандартного образца;

n – специфическая активность стандартного образца в МЕ.

В случае, если при проведении испытания специфическая активность иммуноглобулина не соответствует нормативным требованиям, допускается проведение повторного испытания.

Иммуноглобулин антирабический, разведенный 1:100

Описание. Прозрачная бесцветная жидкость. Определяют визуально.

Прозрачность. Прозрачный раствор с оптической плотностью не более 0,05. Определение проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» в кюветах с толщиной слоя 3 мм при длине волны 540 нм по сравнению с водой очищенной. Метод определения указывают в нормативной документации.

Цветность. Бесцветный раствор с оптической плотностью не более 0,15. Определение проводят спектрофотометрическим методом в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» в кюветах с толщиной слоя 3 мм при длине волны 400 нм по сравнению с водой очищенной. Метод определения указывают в нормативной документации.

pH. От 6,6 до 7,4. Определяют потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Белок. От 0,015 до 0,115 %. Определяют колориметрическим методом с биуретовым реактивом в соответствии с ОФС «Определение белка».

Стерильность. Должен быть стерильным. Испытание на отсутствие бактерий и грибов проводят методом прямого посева или мембранной

фильтрации с использованием тиогликолевой среды в соответствии с ОФС «Стерильность».

Упаковка и **маркировка.** В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты». Указывают вид животного, из крови которого получают препарат.

Транспортирование и хранение. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты» при температуре от 2 до 8 °С.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Иммуноглобулин человека противооспенный	**ФС.3.3.1.0039.15 Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на иммуноглобулин человека противооспенный, раствор для внутримышечного введения, применяемый в качестве лекарственного средства для лечения и экстренной профилактики натуральной оспы. Действующим началом препарата являются иммуноглобулины класса G (IgG), обладающие специфической активностью к ортопоксвирусам.

Иммуноглобулин человека противооспенный относится к специфическим иммуноглобулинам направленного действия.

В составе препарата могут содержаться вспомогательные компоненты: стабилизатор – глицин (аминоуксусная кислота). Его количество должно быть отражено в нормативной документации.

ПРОИЗВОДСТВО

Иммуноглобулин человека противооспенный выделяют из плазмы крови здоровых доноров, предварительно иммунизированных оспенной вакциной в соответствии с инструкцией по применению. Плазма крови здоровых доноров должна соответствовать требованиям ФС «Плазма человека для фракционирования» и содержать антитела к ортопоксвирусам в титре не менее 1:200.

Иммуноглобулин человека противооспенный производится модифицированным методом фракционирования по Кону (метод водно-спиртового осаждения на холоде). Метод основан на физико-химических

отличиях белков и их различной растворимости в присутствии этанола при низких температурах, различной ионной силе, диэлектрической постоянной и pH среды.

Производство иммуноглобулина человека противооспенного должно осуществляться с соблюдением установленных правил организации производства и контроля качества лекарственного препарата, гарантирующих сохранение структуры и функции белков иммуноглобулинов, обеспечивающих специфическую и вирусную безопасность препарата, исключающих его контаминацию чужеродными агентами, а также должно включать стадии производства, обеспечивающие инактивацию и элиминацию инфекционных агентов. Методы очистки и инактивации вирусов указывают в нормативной документации. При инактивации вирусов химическими и фотохимическими методами в нормативной документации производителя необходимо указывать допустимую норму и метод их определения в готовом препарате. Выбор доноров, процессов производства и контроля на производстве иммуноглобулина противооспенного должны соответствовать требованиям ОФС «Иммуноглобулины человека».

Противовирусная эффективность препарата иммуноглобулина человека противооспенного должна быть обеспечена соответствующей степенью концентрации антител в процессе производства (не менее чем в 6 раз при содержании белка в препарате 9 – 11 %).

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачный или слабо опалесцирующий раствор, бесцветный или со светло - желтой окраской, если в нормативной документации не указаны другие требования. В процессе хранения допускается появления незначительного осадка, исчезающего при легком встряхивании. Определение проводят визуально.

Подлинность. При испытании определяют следующие параметры подлинности препарата:

Федеральное электронное медицинское издание

1. ***Видоспецифичность.*** Должен обладать видовой специфичностью, свойственной только белкам сыворотки крови человека. Для определения видоспецифичности белков, входящих в состав препарата иммуноглобулина человека противооспенного, применяют метод иммуноэлектрофореза в геле с использованием сыворотки для иммуноэлектрофореза против белков из сыворотки крови человека, крупного рогатого скота, лошади и свиньи в соответствии с указаниями в нормативной документации в соответствии с ОФС «Иммуноэлектрофорез в агаровом геле». В результате анализа должны выявляться линии преципитации только с сывороткой против белков сыворотки крови человека. Допустимо проведение испытания методом иммунодиффузии в геле в соответствии с ОФС «Иммунодиффузия в геле».

2. ***Специфичность антител.*** Должен содержать антитела к ортопоксвирусам. Определение проводят в реакции нейтрализации, в соответствии с разделом «Специфическая активность».

Извлекаемый объем. Извлекаемый объём должен быть не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объём лекарственных форм для парентерального применения» .

Цветность. Бесцветный или светло-желтый раствор (если нет других указаний в нормативной документации). Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

Допустимо спектрофотометрическое определение оптической плотности раствора. Метод определения указывают в нормативной документации.

Прозрачность. Прозрачный или слегка опалесцирующий раствор (если нет других указаний в нормативной документации). Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачности и степень мутности жидкостей».

Допустимо спектрофотометрическое определение оптической плотности испытуемого раствора иммуноглобулина. Метод определения указывают в нормативной документации.

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH. От 6,6 до 7,4. Испытуемый образец разводят до 1 % концентрации 0,9 % раствором натрия хлорида. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Белок. От 9 до 11 %. Определение проводят колориметрическим методом с биуретовым реактивом в соответствии с ОФС «Определение белка».

Электрофоретическая однородность. Фракция иммуноглобулинов должна составлять не менее 95 % от общего белка. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Определение однородности лекарственных препаратов из сыворотки крови человека и животных методом электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы».

Молекулярные параметры. Содержание мономеров и димеров иммуноглобулина G должно быть не менее 85 %, полимеров и агрегатов – не более 10 %. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Определение молекулярных параметров иммуноглобулинов методом ВЭЖХ», если нет других указаний в нормативной документации.

Фракционный состав. Должна выявляться интенсивная линия преципитации IgG и не более 4 дополнительных линий. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Иммуноэлектрофорез в агаровом геле» с использованием сыворотки для иммуноэлектрофореза против белков сыворотки крови человека.

Термостабильность. Препарат должен оставаться жидким и не образовывать геля после выдерживания в водяной бане или водяном термостате при температуре (56 ± 1) °С в течение 4 ч. Определение проводят визуально.

Стерильность. Должен быть стерильным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность. Должен быть апирогенным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Объем вводимого препарата не должен превышать 1,5 мл на 1 кг массы кролика.

Аномальная токсичность. Должен быть нетоксичным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

Препарат вводят внутрибрюшинно 5 белым мышам массой 17 – 20 г по 0,5 мл и 2 морским свинкам массой 250 – 300 г – по 5 мл (по 2,5 мл в каждый бок) подкожно. Наблюдение за животными проводят в течение 7 сут.

Специфическая активность. Содержание антител к ортопоксвирусам должно быть не менее 1:4000. Определение проводят в реакции нейтрализации путем введения смеси разведений иммуноглобулина с рабочим разведением вирусного материала на хорионаллантоисные оболочки (ХАО) 12-дневных куриных эмбрионов.

Методика испытания

Подготовка куриных эмбрионов. Проводят овоскопию куриных эмбрионов в затемненном помещении. Каждый эмбрион просматривают в направленном пучке света. Свет должен падать сверху на тупой конец яйца. Яйцо с погибшим эмбрионом или с кровоизлиянием под оболочкой бракуют. В центре воздушного мешка на тупом конце яйца и на боковой поверхности яйца, на участке между сосудами и их ответвлениями карандашом делают отметку. В местах отметок с соблюдением правил асептики пропиливают бормашиной с абразивным диском отверстия (щели) длиной 3 – 4 мм и шириной 1,5 мм, не повреждая оболочки. Яйцо укладывают так, чтобы отверстие на боковой стороне было обращено вверх. Подскорлупную оболочку в центре воздушного мешка прорывают плоской полукруглой хирургической иглой. Затем на отверстие, расположенное на боковой поверхности, вносят 0,1 мл 0,004 М стерильного фосфатно-цитратного буферного (ФЦБ) раствора Мак-Илвейна, подогретого до температуры (50 ±

5) °С, и той же иглой осторожно продавливают подскорлупную оболочку. После этого практически вся капля раствора проходит под подскорлупную оболочку и частично отслаивает ХАО.

Из отверстия в центре воздушного мешка резиновой грушей осторожно отсасывают воздух до полного опускания ХАО и создания искусственного воздушного мешка под боковой щелью. Для контроля наличия и величины искусственного воздушного мешка вновь проводят овоскопию и бракуют эмбрионы, имеющие кровоизлияния, воздушные мешки под ХАО или без искусственных воздушных мешков. Яйца с опущенной ХАО помещают на лотки отверстием вверх и выдерживают 2 ч в термостате при температуре (37 ± 1) °С. Затем проводят овоскопию повторно и бракуют эмбрионы с воздушными мешками под ХАО, без искусственных воздушных мешков и имеющие кровоизлияния.

Определение рабочего разведения вируса. Для постановки реакции нейтрализации используют подготовленные куриные эмбрионы, стандартный образец активности, специфичности и некротической активности оспенной вакцины в качестве вируса и испытуемый иммуноглобулин.

Определяют рабочее разведение вируса титрованием на ХАО 12-дневных куриных эмбрионов. Для этого готовят ряд последовательных десятикратных разведений вируса на ФЦБ. По 6 куриных эмбрионов заражают каждым разведением вируса, нанося на ХАО по 0,1 мл. Инкубируют в термостате 48 ч при температуре (37 ± 1) °С, затем проводят учет результатов. Эмбрионы вскрывают, подсчитывают количество развившихся на ХАО оспин и рассчитывают среднее арифметическое для каждого разведения. Для нейтрализации используют то разведение вируса, которое дает на ХАО от 40 до 80 оспин, если нет других указаний в нормативной документации.

Постановка реакции нейтрализации. Готовят разведения иммуноглобулина человека противооспенного на ФЦБ: 1:1000; 1:2000; 1:3000; 1:4000 (если нет других указаний в нормативной документации) и

контрольного отрицательного образца донорской сыворотки от 1:250 до 1:500 в объеме 0,5 – 1 мл. Смешивают равные объемы каждого разведения иммуноглобулина или контрольного отрицательного образца донорской сыворотки и рабочего разведения вируссодержащей жидкости. После смешивания разведения удваиваются и становятся равными соответственно для проб иммуноглобулина: 1:2000; 1:4000; 1:6000; 1:8000; для контрольного отрицательного образца донорской сыворотки – 1:500; 1:1000. Смеси выдерживают при температуре (37 ± 1) °С в течение 2 ч. После инкубации наносят по 0,1 мл каждого разведения смеси на ХАО куриных эмбрионов, используя для каждого разведения по 5 – 6 эмбрионов. Инкубируют в термостате 48 ч при температуре (37 ± 1) °С. Эмбрионы вскрывают, рассчитывают среднее арифметическое количество оспин для каждого разведения иммуноглобулина и контрольного образца.

Чувствительность куриных эмбрионов к вирусу осповакцины определяют в каждом испытании по показателю «Специфическая активность» стандартного образца активности, специфичности и некротической активности оспенной вакцины на ХАО куриных эмбрионов согласно инструкции по его применению.

Учет результатов. В исследовании должны быть подтверждены установленный показатель специфической активности стандартного образца активности, специфичности и некротической активности оспенной вакцины. Титром испытуемого препарата иммуноглобулина человека противооспенного считают его конечное разведение, дающее нейтрализацию не менее 50 % оспин от числа оспин, образуемых вирусом осповакцины в сочетании с контрольным отрицательным образцом донорской сыворотки.

Примечания.

1. Приготовление ФЦБ раствора Мак-Илвейна 0,004 М, pH (7,2 – 7,4). Готовят растворы 1 и 2.

Раствор 1: Лимонная кислота – 2,1 г; вода очищенная – 100 мл.

Раствор 2: В мерной колбе вместимостью 1000 мл в воде очищенной растворяют 28,4 натрия гидрофосфата безводного или 35,6 г натрия

гидрофосфата дигидрата или 71,6 г натрия гидрофосфата додекагидрата, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Смешивают 2 мл раствора 1 и 18 мл раствора 2 в мерной колбе вместимостью 1000 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Полученный раствор должен иметь pH 7,2 – 7,4. Если pH полученного раствора более 7,4, его доводят до нормы раствором 1. В случае, если pH полученного раствора меньше 7,2, приготовление раствора повторяют. Буферный раствор стерилизуют при температуре (120 ± 1) °С и давлении (0,1 ± 0,01) МПа в течение 8 – 30 мин (в зависимости от объема) или фильтруют через мембраны с диаметром пор 0,22 мкм и хранят при температуре от 2 до 8 °С. Срок хранения от 10 до 30 сут в зависимости от способа укупорки флаконов (способ укупорки флаконов должен быть указан в нормативной документации).

Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg). Препарат не должен содержать поверхностного антигена вируса гепатита В. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения Российской Федерации, в соответствии с инструкциями по применению. Чувствительность тест-системы для определения поверхностного антиген вируса гепатита В (HBsAg) должна быть не ниже 0,1МЕ/мл.

Антитела к вирусу гепатита С. Антитела к вирусу гепатита С должны отсутствовать. Определение проводят в соответствии с инструкциями по применению иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения Российской Федерации и имеющих 100 % чувствительность и специфичность.

Антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Препарат не должен содержать антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1, ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Определение проводят в соответствии с инструкциями по применению иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения Российской Федерации и имеющих 100 % чувствительность и специфичность.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные препараты из плазмы крови человека»».

На вторичную (потребительскую) упаковку лекарственных средств должна наноситься надпись: «Антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, к вирусу гепатита С и поверхностный антиген вируса гепатита В отсутствуют».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Интерферон человеческий лейкоцитарный	**ФС.3.3.1.0040.15** **Взамен ФС 42-3433-97**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на интерферон человеческий лейкоцитарный, представляющий собой группу белков (интерфероны альфа-типа), синтезируемых лейкоцитами, которые получены из крови клинически здоровых доноров в ответ на воздействие вируса – индуктора интерферона (вирус болезни Ньюкасла или вирус Сендай).

Основными характеристиками интерферона человеческого лейкоцитарного являются:

- универсальность (активен против большинства ДНК- и РНК-содержащих вирусов);

- выраженная видоспецифичность;

- последействие (после удаления вируса в обработанных клетках сохраняется способность подавлять размножение вируса);

- нечувствительность к антителам против вирусов, индуцирующих их образование.

ПРОИЗВОДСТВО

Характеристика производственных штаммов

Для производства интерферона лейкоцитарного человеческого в качестве интерфероногена используют вирус болезни Ньюкасла (NDV) или вирус парагриппа Сендай, депонированные в национальной или международной коллекции.

Федеральная электронная медицинская библиотека ФГБУ

Вирус болезни Ньюкасла не должен быть контаминирован бактериями (в том числе микоплазмами) и посторонними вирусами. Инфекционная активность NDV должна быть не менее 10^8 $ТЦД_{50}$/мл, титр гемагглютининов – не менее 1:128 ГАЕ/мл при использовании штамма «Н» вируса болезни Ньюкасла и не менее 1:256 ГАЕ/мл при использовании ts-мутанта штамма «Н» вируса болезни Ньюкасла.

Вирус болезни Ньюкасла должен оказывать цитопатическое действие на 3-суточную культуру куриных фибробластов; репродуцироваться в 9 –11-суточных куриных эмбрионах при температуре (37 ± 1) ^{0}С; для ts-мутанта штамма «Н» вируса болезни Ньюкасла – при температуре (32 ± 1) ^{0}С в течение 48 ч.

Вирус Сендай не должен быть контаминирован бактериями (в том числе микоплазмами) и посторонними вирусами; титр гемагглютининов должен быть не менее 1:16000 ГАЕ/мл при отсутствии цитопатического действия; должен репродуцироваться в 10 – 11 суточных куриных эмбрионах при температуре (37 ± 1) ^{0}С в течение 72 ч.

Требования к донорской крови определяются в соответствии с национальными требованиями, включая**:**

- стерильность, хранение при температуре от 2 до 8 ^{0}С не более 48 ч с момента забора;

- количество жизнеспособных лейкоцитов при подсчете должно быть не менее 70 %.

Требования к куриным эмбрионам определяются в соответствии с национальными требованиями, включая**:**

- эмбрионы должны быть получены от здоровых кур из благополучных в эпизоотическом отношении птицеводческих хозяйств, при отсутствии заболеваемости кур туберкулезом, оспой и другими инфекциями птиц; возраст эмбрионов при использовании вируса болезни Ньюкасла – 9 – 11 сут; при использовании вируса Сендай – 10 – 11 сут; сеть кровеносных сосудов при овоскопии должна быть хорошо развита;

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Ветеринарный электронный научный журнал»

- хранение и транспортировка оплодотворенного яйца до инкубации осуществляется согласно ОСТ Стандарт отрасли "Яйца инкубационные. Технические условия";

- аллантоисная вируссодержащая жидкость и главный посевной материал (лиофилизированная аллантоисная вируссодержащая жидкость) не должны быть контаминированы бактериями (в том числе микоплазмами). Инфекционная активность должна быть не менее 10^8 $ТЦД_{50}$/мл.

Питательные среды

Производственные питательные среды не должны содержать компонентов, вызывающих аллергические или иные нежелательные реакции у человека. Сырье, реактивы и реагенты, используемые при производстве питательных сред, должны быть подтверждены сертификатами (паспортами) качества. Питательные среды должны быть стерильными.

Основные стадии производства и контроля интерферона:

- получение вируса-индуктора (контрольные параметры (КП) – стерильность; гемагглютинирующая активность вируса);

- получение «чистых» лейкоцитов (КП – стерильность; отсутствие поверхностного антигена вируса гепатита В; отсутствие антител к вирусу гепатита С, вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1, ВИЧ-2) и возбудителю сифилиса; отсутствие нуклеиновых кислот вирусов гепатита В и С, ВИЧ и других вирусов в соответствии с национальными требованиями; количество жизнеспособных лейкоцитов; объем загрузки в реактор или общий объем в бутылях при роллерном культивировании лейкоцитов);

- индукция интерфероногенеза и биосинтез интерферона (КП – гемагглютинирующая активность вируса-индуктора; температура в реакторе или в термокомнате; время прохождения стадии; скорость вращения центрифуги; pH);

- очистка полуфабриката интерферона (КП – температура и давление внутри емкости с полуфабрикатом при культивировании в реакторе; стерильность; специфическая активность; специфическая безопасность; pH);

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

- розлив (КП – номинальный объем; визуальный осмотр; стерильность);

- сублимационное высушивание – для лиофилизированных форм (КП – температура полок и время замораживания);

- контроль препарата в первичной упаковке;

- упаковка, маркировка (КП – соответствие упаковки и маркировки).

Перечень показателей качества различных лекарственных форм препаратов интерферона и требования к ним приводятся в нормативной документации.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Приводят описание физических свойств соответствующей лекарственной формы лекарственного средства.

Подлинность. Должен представлять собой интерферон альфа-типа. Определение проводят в соответствии с ОФС «Биологические методы испытания препаратов интерферона с использованием клеточных культур».

Специфическая активность. Значение показателя должно соответствовать требованиям нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Биологические методы испытания препаратов интерферона с использованием культур клеток».

Овальбумин. Содержание овальбумина должно быть не более 0,05 мкг/мл. Определение проводят методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием тест-систем в соответствии с ОФС «Метод иммуноферментного анализа».

Время растворения (для лиофилизированных форм). Не более 3 мин, если нет других указаний в нормативной документации. В ампулу вносят 2 мл растворителя, предусмотренного требованиями нормативной документации. Наблюдают визуально процесс растворения, время полного растворения определяют с помощью секундомера.

Извлекаемый объем (для жидких форм). Не менее номинального. Определяют в соответствии с ОФС «Извлекаемый объём лекарственных форм для парентерального применения».

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Цветность. Должен соответствовать требованиям нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

Прозрачность. Должен выдерживать сравнение с эталоном II. Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Механические включения (для инъекционных форм). Должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах» и ОФС «Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения».

pH. Допустимый интервал значений должен соответствовать требованиям нормативной документации. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия». В случае определения pH после растворения следует указать растворитель и его объем.

Потеря в массе при высушивании (для лиофилизированных форм). Значение показателя не должно превышать 3,5 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Белок. Содержание белка должно соответствовать требованиям нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение белка» методом с биуретовым реактивом или в соответствии с ОФС «Определение белка колориметрическим методом (метод Лоури) в иммунобиологических лекарственных препаратах» (метод А без предварительного осаждения белка).

Стерильность. Препарат должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Микоплазмы. Должны отсутствовать. Определение проводят в соответствии с ОФС «Испытание на присутствие микоплазм».

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичным. Определение проводят по ОФС «Аномальная токсичность».

Токсичность. Препарат не должен оказывать токсического действия на культуру клеток.

Для определения токсичности препарата используют однослойные перевиваемые или диплоидные клеточные культуры, чувствительные к данному типу интерферона и применяемые для определения его специфической активности. Клетки выращивают способом, предусмотренным для данного вида (так же, как и для определения специфической активности). В лунки с 1 – 3-суточным монослоем вносят по 0,1 мл препарата интерферона в разведении, указанном в нормативной документации для каждого конкретного препарата. В лунки с контрольной культурой вносят поддерживающую среду без препарата интерферона. Культуры выдерживают в течение 24 – 48 ч при температуре (37 ± 1) ^{0}С в атмосфере с (5,0 ± 0,5) % CO_2, после чего просматривают под микроскопом. Клеточный монослой должен оставаться неповрежденным, без признаков дегенерации и не отличаться от контрольных проб.

Специфическая безопасность. Препарат не должен содержать живого вируса – индуктора интерферона. Испытание на полноту инактивации вируса-индуктора проводят одним из 2 методов: с использованием 9 – 11-суточных куриных эмбрионов или культуры клеток куриных фибробластов.

1. Испытание на куриных эмбрионах. Испытуемый препарат вводят по 0,2 мл в аллантоисную полость 9 – 11 суточных эмбрионов (не менее 5). Инкубируют при температуре (37 ± 1) ^{0} С в течение 48 ч (при использовании в качестве индуктора интерферона вируса болезни Ньюкасла) или в течение 72 ч (при использовании вируса Сендай). После инкубации эмбрионы должны оставаться жизнеспособными. Отдельно из каждого эмбриона отсасывают аллантоисную жидкость и проверяют ее в реакции гемагглютинации. Для этого в лунки планшетов для серологических реакций вносят по 0,5 мл аллантоисной жидкости. Затем в каждую лунку добавляют

равный объем 0,5 % суспензии куриных эритроцитов в 0,9 % растворе натрия хлорида или в буферном растворе. Результаты учитывают визуально через 20 – 30 мин после оседания эритроцитов. Гемагглютинация во всех проверяемых образцах должна отсутствовать. При гибели хотя бы 1 эмбриона или наличии гемагглютинации хотя бы в 1 пробе испытание повторяют на удвоенном количестве эмбрионов. В случае повторной гибели эмбрионов или выявлении гемагглютинации препарат считают не прошедшим испытание.

2. Испытание на фибробластах куриных эмбрионов. Испытание на фибробластах куриных эмбрионов проводят в однослойной культуре клеток, выращенной в лунках 96-луночного плоскодонного планшета на питательной среде 199 или Игла-МЕМ, содержащей 5 – 10 % сыворотки крови крупного рогатого скота, 100 ед/мл бензилпенициллина натриевой соли и 100 мкг/мл гентамицина сульфата или канамицина сульфата. Посевная доза – не менее $5 \cdot 10^4$ кл/0,1 мл на лунку. Планшеты с культурой клеток инкубируют 3 – 4 сут при температуре (37 ± 1) ^{0}C в атмосфере 5 % CO_2 при влажности (70 ± 5) %. Среду сливают и в лунки планшетов вносят по 0,1 мл испытуемого препарата интерферона в разведении 1:5 в питательной среде 199 или Игла-МЕМ. На каждый образец препарата используют не менее 4 лунок. В такое же количество лунок с контрольной культурой клеток вносят питательную среду без препарата. Учет проводят под микроскопом при 100-кратном увеличении через 48 – 72 ч инкубации. Монослой клеток должен оставаться неповрежденным, цитопатическое действие должно отсутствовать. При наличии дегенерации культуры клеток испытание повторяют. При повторном выявлении цитопатического действия испытуемого препарата и в отсутствие цитопатического эффекта в контрольных лунках препарат считают не прошедшим испытание.

Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg). Препарат не должен содержать поверхностного антигена вируса гепатита В. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем,

разрешенных к применению в практике здравоохранения Российской Федерации и имеющих чувствительность не ниже 0,1 нг/мл.

Антитела к вирусу гепатита С. Антитела к вирусу гепатита С должны отсутствовать. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения Российской Федерации и имеющих 100 % чувствительность и специфичность, в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2). Препарат не должен содержать антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2). Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения Российской Федерации и имеющих чувствительность и специфичность не ниже 100 %.

Маркировка и упаковка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

На вторичную (потребительскую) упаковку лекарственных средств должна наноситься надпись: «Антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, к вирусу гепатита С и поверхностный антиген вируса гепатита В отсутствуют».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 ^{0}С, если в нормативной документации нет других указаний. Не замораживать.

ФЭМБ Федеральный электронный медицинский библиотека

Сыворотка противогангренозная поливалентная лошадиная	**ФС.3.3.1.0041.15** **Взамен ФС 42-3616-98**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на сыворотку противогангренозную поливалентную лошадиную, представляющую собой иммуноглобулиновую фракцию сыворотки крови лошадей, содержащую специфические антитела, нейтрализующие токсины возбудителей газовой гангрены рода *Clostridium* (*C. perfringens* типа А, *C. novyi* и *C. septicum*).

Сыворотка противогангренозная поливалентная лошадиная предназначена для экстренной профилактики и лечения газовой гангрены.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство сыворотки противогангренозной поливалентной лошадиной должно быть валидировано с целью подтверждения установленных требований, гарантирующих ее качество и безопасность применения.

Сыворотку получают из плазмы лошадей, гипериммунизированных гангренозными токсинами/анатоксинами. Для получения очищенной концентрированной иммуноглобулиновой фракции плазмы лошади, содержащей антитела (антитоксины), нейтрализующие гангренозные экзотоксины, применяют методы солевого фракционирования, ферментолиза и мембранной фильтрации.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость с желтоватым оттенком, без осадка. Определение проводят визуально.

Подлинность. Должна нейтрализовать действие токсинов, продуцируемых *C. perfringens* типа А, *C. novyi* и *C. septicum*. Определение проводят, как описано в разделе «Специфическая активность».

Прозрачность. Показатель оптической плотности не должен превышать 0,05. Определение проводят фотометрическим методом при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 3 мм против контрольного раствора – воды очищенной, если нет других указаний в нормативной документации.

Цветность. Показатель оптической плотности не должен превышать 0,15. Определение проводят фотометрическим методом при длине волны 400 нм в кювете с толщиной слоя 3 мм против контрольного раствора – воды очищенной, если нет других указаний в нормативной документации.

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH. От 6,8 до 7,2, если не указано иначе в нормативной документации. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Белок. От 8 до 14 %, если не указано иначе в нормативной документации. Определение проводят колориметрическим методом с биуретовым реактивом в соответствии с ОФС «Определение белка».

Стерильность. Должна быть стерильной. Испытания проводят методами прямого посева или мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность. Должна быть апирогенной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность», если не указано иначе в нормативной

документации производителя. Указывают допустимые пределы изменения температуры тела животных и тест-дозу. Если не указано иначе, вводят внутривенно 1 мл неразведенной сыворотки на 1 кг массы кролика.

Аномальная токсичность. Должна быть нетоксичной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

Специфическая активность. Не менее 700 международных единиц (МЕ) каждого типа гангренозных антитоксинов в 1 мл. Специфическую активность сыворотки по каждому типу гангренозных антитоксинов определяют в тесте нейтрализации соответствующих токсинов.

Определение опытных доз гангренозных токсинов. Опытная доза токсина (L+/) представляет собой наименьшее количество токсина, которое в смеси с определенным количеством соответствующего антитоксина при внутривенном введении белым мышам вызывает гибель не менее 50 % животных.

Опытную дозу токсина *C. perfringens* ($L+_{/10}$) определяют по отношению к 0,1 МЕ антитоксина *C. perfringens*, токсина *C. septicum* ($L+_{/5}$) – по отношению к 0,2 МЕ антитоксина *C. septicum*, токсина *C. novyi* ($L+_{/50}$) – по отношению к 0,02 МЕ антитоксина *C. novyi*.

Для определения опытных доз для каждого из гангренозных токсинов готовят не менее 4 последовательных разведений, отличающихся между собой по содержанию токсина на 10 – 20 %. К 0,1 МЕ референс-препарата (или стандартного образца активности) антитоксина *C. perfringens*, или 0,2 МЕ референс-препарата (или стандартного образца активности) антитоксина *C. septicum*, или 0,02 МЕ референс-препарата (или стандартного образца активности) антитоксина *C. novyi*, взятых в объеме 0,2 мл, добавляют подготовленные разведения токсинов в объеме 0,3 мл. Смеси готовят из расчета на 5 мышей (1 мл стандартного образца активности антитоксина и 1,5 мл токсина).

Полученные смеси перемешивают и выдерживают при температуре от 18 до 22 °С в течение (45 ± 1) мин, затем каждую вводят по 0,5 мл

внутривенно 4 белым мышам.

При определении опытной дозы токсинов *C. perfringens* и *C. septicum* наблюдают за животными в течение 48 ч, а при определении опытной дозы токсина *C. novyi* – в течение 96 ч, отмечая количество выживших мышей в каждой группе.

Определение специфической активности (титра) сыворотки противогангренозной C. perfringens. Готовят ряд разведений испытуемой поливалентной противогангренозной сыворотки в 0,9 % растворе натрия хлорида с таким расчетом, чтобы, в зависимости от предполагаемого титра, 0,1 МЕ содержалось в 0,2 мл раствора. К 1 мл каждого разведения сыворотки добавляют 1,5 мл токсина *C. perfringens*, содержащего в объеме 0,3 мл опытную дозу. Определение проводят с 6 – 8 разведениями сыворотки (например, 1:1300; 1:1400; 1:1500 и т.д.), отличающимися по своей предполагаемой активности одно от другого на 10 – 20 %.

Каждый опыт титрования (приготовления разведений испытуемой сыворотки) сопровождают контролем опытной дозы токсина, вводимой в смеси с 0,1 МЕ стандартного образца активности антитоксина *C. perfringens*. После выдерживания при температуре от 18 до 22 °С в течение (45 ± 1) мин смесь из каждой пробирки вводят 4 белым мышам внутривенно в объеме 0,5 мл. За животными наблюдают в течение 48 ч. К концу наблюдения в контроле должно погибнуть не менее 50 % взятых в опыт мышей. Максимальное разведение сыворотки, предохраняющее от гибели 100 % мышей в данной группе, содержит 0,1 МЕ в 0,2 мл, т.е. 0,5 МЕ в 1 мл.

Титр антитоксина *C. perfringens* в испытуемой сыворотке рассчитывают, исходя из взятых в опыт разведений. Например, если максимальное разведение сыворотки, защищающее от гибели 100 % мышей, соответствует 1:1300, то 1 мл этого разведения содержит 0,5 МЕ антитоксина *C. perfringens*, следовательно, 1 мл испытуемой сыворотки содержит 0,5 МЕ 1300 = 650 МЕ антитоксина *C. perfringens*.

Определение титра антитоксина C. septicum. Готовят ряд разведений испытуемой поливалентной противогангренозной сыворотки в 0,9 % растворе натрия хлорида с таким расчетом, чтобы, в зависимости от предполагаемого титра, в 0,2 мл разведенной сыворотки содержалось 0,2 МЕ. К 1 мл каждого разведения сыворотки добавляют 1,5 мл токсина *C. septicum*, содержащего в объеме 0,3 мл опытную дозу. Определение проводят с 6 – 8 разведениями сыворотки (например, 1:650; 1:700; 1:750 и т.д.), отличающимися по своей предполагаемой активности одно от другого на 10 – 20 %.

Каждый опыт титрования испытуемой сыворотки сопровождают контролем опытной дозы токсина, вводимой в смеси с 0,2 МЕ стандартного образца активности антитоксина *C. septicum*. После выдерживания при температуре от 18 до 22 °С в течение (45 ± 1) мин смесь токсина с каждым разведением сыворотки вводят 4 белым мышам внутривенно в объеме 0,5 мл. За животными наблюдают в течение 48 ч. К концу наблюдения в контроле должно погибнуть не менее 50 % взятых в опыт мышей. Максимальное разведение сыворотки, предохраняющее от гибели 100 % мышей в группе, содержит 0,2 МЕ в 0,2 мл, т.е. 1 МЕ в 1 мл. Титр антитоксина *C. septicum* в испытуемой сыворотке рассчитывают, исходя из взятых в опыт разведений. Например, если максимальное разведение сыворотки, защищающее от гибели 100 % мышей, соответствует 1:700, то 1 мл этого разведения содержит 1 МЕ, следовательно, 1 мл неразведенной сыворотки содержит 1 МЕ 700 = 700 МЕ антитоксина *C. septicum*.

Определение титра антитоксина C. novyi. Готовят ряд разведений испытуемой поливалентной противогангренозной сыворотки в 0,9 % растворе натрия хлорида с таким расчетом, чтобы, в зависимости от предполагаемого титра, 0,02 МЕ содержались в 0,2 мл раствора. К 1 мл каждого разведения сыворотки добавляют 1,5 мл токсина, содержащего в объеме 0,3 мл опытную дозу. Определение проводят с 6 – 8 разведениями сыворотки (например, 1:6500; 1:7000; 1:7500 и т.д.), отличающимися по

предполагаемой активности одно от другого на 10 – 20 %. Каждый опыт титрования сопровождают контролем опытной дозы токсина, вводимой в смеси с 0,02 МЕ стандартного образца активности антитоксина *C. novyi*. После инкубирования при температуре от 18 до 22 °С в течение (45 ± 1) мин каждую смесь вводят 4 белым мышам внутривенно в объеме 0,5 мл. За животными наблюдают в течение 96 ч. К концу наблюдения в контроле должно погибнуть не менее 50 % взятых в опыт мышей.

Максимальное разведение сыворотки, предохраняющее от гибели 100 % взятых в опыт белых мышей, содержит 0,02 МЕ в 0,2 мл, т.е. 0,1 МЕ в 1 мл. Титр антитоксина *C. novyi* в испытуемой сыворотке рассчитывают, исходя из взятых в опыт разведений. Например, если максимальное разведение сыворотки, защищающее от гибели 100 % мышей, соответствует 1:8000, то в 1 мл этого разведения содержится 0,1 МЕ антитоксина *C. novyi.* Следовательно, 1 мл неразведенной сыворотки содержит 0,1 МЕ 8000 = 800 МЕ антитоксина *C. novyi*.

Активность каждого компонента поливалентной сыворотки рассчитывают, исходя из разведения с наименьшей концентрацией сыворотки, которое в смеси с опытной дозой токсина обеспечивает 100 % выживаемость взятых в опыт животных.

Специфическую активность (титр) поливалентной сыворотки выражают по компоненту с наименьшей активностью. В данном примере – по антитоксину *C. perfringens*.

Удельная активность. Не менее 500 МЕ на 0,1 г белка каждого типа антитоксина *C. perfringens*, *C. novyi*, *C. septicum*.

Удельную активность (*X*) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{T}{C \cdot 10},$$

где: *T* – титр сыворотки, МЕ/мл;

C – концентрация белка, г/мл;

10 – постоянный коэффициент

Сульфат-ионы. Не более 0,025 %. Определение проводят колориметрическим методом. К 5 мл испытуемого образца и 5 мл рабочего эталонного раствора прибавляют по 0,5 мл 5 % раствора бария хлорида и перемешивают. Через 15 мин пробы перемешивают и измеряют оптическую плотность суспензий при длине волны 540 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм против контрольного раствора, содержащего 5 мл образца и 0,5 мл воды очищенной, для эталонного раствора – вода очищенная (5 мл).

Испытание проводят в 2 повторностях. Для расчета используется среднее значение.

Расчет содержания сульфат-ионов (X) в процентах производят по формуле:

$$X = \frac{0{,}002\ \% \cdot A_{опыт}}{A_{эталон}},$$

где: $A_{опыт}$ – значение оптической плотности испытуемого образца;

$A_{эталон}$ – значение оптической плотности рабочего эталонного раствора.

Примечания.

1. Приготовление основного раствора калия сульфата (1 мг/мл сульфат-ионов). В мерной колбе вместимостью 1000 мл в воде очищенной растворяю 1,8140 г калия сульфата, высушенного до постоянной массы при температуре 100 – 105 °С, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 1 года.
2. Приготовление рабочего эталонного раствора калия сульфата (0,002 % сульфат-ионов). В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1 мл основного раствора калия сульфата, доводят водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Натрия хлорид. От 0,85 до 0,95 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение хлоридов методом обратного осадительного титрования в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Хлороформ. Не более 0,1 %. Определение проводят колориметрическим методом, основанным на способности хлороформа образовывать с резорцином в щелочной среде соединение хиноидной структуры, которое дает цветную реакцию.

ФЭМБ Электронная медицинская библиотека

В пробирки вносят по 0,1 мл испытуемого образца и образца сравнения (0,1 % раствор хлороформа), добавляют 0,9 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, 2 мл 20 % раствора натрия гидроксида, 1 мл 10 % раствора резорцина и перемешивают. Содержимое пробирок перемешивают и нагревают на кипящей водяной бане в течение 1 мин. Пробы осторожно охлаждают до температуры 15 – 18 ^{0}С, затем измеряют оптическую плотность окрашенного раствора при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 5 мм по сравнению с контрольным раствором, состоящим из 1 мл воды очищенной, 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и 2 мл 20 % раствора натрия гидроксида. Раствор резорцина в контрольный раствор не добавляют, т.к. продукты его окисления окрашиваются в зеленый цвет.

Расчет содержания хлороформа проводят путем сравнения оптической плотности испытуемого образца и образца сравнения (0,1 % раствор хлороформа).

Содержание хлороформа (X) в процентах в испытуемом образце вычисляют по формуле:

$$X = \frac{0{,}1 \cdot A\text{исп}}{A\,\text{ст}},$$

где: $A_{\text{исп}}$ – значение оптической плотности испытуемого образца;

$A_{\text{ст}}$ – значение оптической плотности образца сравнения – 0,1 % раствора хлороформа.

Примечания.

1. Приготовление 0,1 % раствора хлороформа. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,1 мл хлороформа, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор используют через 24 часа.

2. Приготовление 10 % раствора резорцина. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 5 г резорцина, растворяют в 30 мл воды очищенной, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объём лекарственных форм для парентерального применения».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 ºС, если не указано иначе в нормативной документации. Замораживание не допускается.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Сыворотки противоботулинические типов А, В, Е лошадиные	**ФС.3.3.1.0042.15** **Взамен ГФ X, ст. 608, ФС 42-3814-99**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на сыворотки противоботулинические типов А, В и Е, представляющие собой иммуноглобулиновые фракции сыворотки крови лошадей, содержащие специфические антитела, нейтрализующие ботулинические токсины типов А, В или Е. Сыворотки предназначены для экстренной профилактики и лечения ботулизма.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство сывороток противоботулинических типов А, В и Е должно быть валидировано с целью подтверждения установленных требований и гарантирующее качество и безопасность их применения.

Сыворотки получают из плазмы крови лошадей, гипериммунизированных соответствующими ботулиническими анатоксинами/токсинами. Полученную иммуноглобулиновую фракцию плазмы крови лошади, содержащую антитела (антитоксины), нейтрализующие ботулинический токсин соответствующего типа, очищают и концентрируют методами солевого фракционирования, ферментолиза и мембранной фильтрации.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость с желтоватым оттенком, без осадка. Определение проводят визуально.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Подлинность. Сыворотка должна нейтрализовывать действие ботулинических токсинов типов А, В и/или Е. Определение проводят, как описано в разделе «Специфическая активность».

Прозрачность. Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость. Показатель оптической плотности не должен превышать 0,05. Определение проводят фотометрическим методом при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 3 мм, если нет других указаний в нормативной документации.

Цветность. Жидкость с желтоватым оттенком. Показатель оптической плотности не должен превышать 0,15. Определение проводят фотометрическим методом при длине волны 400 нм в кювете с толщиной слоя 3 мм, если нет других указаний в нормативной документации.

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH. От 6,8 до 7,2, если не указано иначе в нормативной документации производителя. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Содержание белка. От 8 до 12 %, если не указано иначе в нормативной документации производителя. Определение проводят колориметрическим методом с биуретовым реактивом в соответствии с ОФС «Определение белка».

Стерильность. Должна быть стерильной. Испытания проводят методами прямого посева или мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность. Должна быть апирогенной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность», если не указано иначе в нормативной документации. Указывают допустимые пределы изменений температуры тела у животных и тест-дозу. Если не указано иначе, вводят 1 мл неразведенной сыворотки на 1 кг массы кролика.

Федеральный институт лекарственной библиотеки

Аномальная токсичность. Должна быть нетоксичной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность», если нет других указаний в нормативной документации.

Специфическая активность. Не менее 2500 международных единиц (МЕ) в 1 мл – для противоботулинической сыворотки типа А, не менее 600 МЕ/мл – для противоботулинической сыворотки типа В и не менее 1200 МЕ/мл – для противоботулинической сыворотки типа Е. Специфическую активность противоботулинических сывороток каждого серотипа в отдельности определяют в тесте нейтрализации соответствующих токсинов (1 МЕ ботулинического антитоксина – это специфически нейтрализующая активность антитоксической сыворотки в отношении ботулинического токсина одноименного типа, которая содержится в определенном количестве международного стандартного образца, представляющего собой противоботулиническую лиофилизированную лошадиную сыворотку определенного серотипа).

Определение опытной дозы ботулинических токсинов. Опытная доза (L+/5) ботулинических токсинов типа А, В и Е представляет собой наименьшее количество токсина, которое в смеси с 0,2 МЕ антитоксической противоботулинической сыворотки одноименного типа при введении мышам вызывает гибель 50 % животных (при явлениях ботулизма) на 4 сут.

Для определения опытной дозы готовят несколько разведений ботулинического токсина, различающихся между собой на 10 – 20 %.

При определении L+/5 токсина используют стандартный образец (СО) активности противоботулинической сыворотки соответствующего типа, калиброванный в МЕ, который разводят 0,9 % раствором натрия хлорида с таким расчетом, чтобы в 1 мл раствора содержалась 1 МЕ (0,2 МЕ в 0,2 мл). Смешивают 1 мл СО активности противоботулинической сыворотки с 1,5 мл раствора ботулинического токсина одноименного типа разной концентрации, начиная с наименьшей. Смеси токсина с сывороткой осторожно перемешивают, выдерживают при температуре от 18 до 22 °С в течение (45 ±

1) мин, затем вводят по 0,5 мл внутривенно 4 белым мышам массой 16 – 18 г. За животными наблюдают 4 сут, отмечая у них появление симптомов ботулизма. Определяют то разведение токсина, которое в смеси со стандартным образцом соответствующего антитоксина вызвало гибель 50 % животных при явлениях ботулизма.

Определение специфической активности (титра) противоботулинической сыворотки. Исходя из предполагаемой активности, сыворотку разводят 0,9 % раствором натрия хлорида до концентрации 1 МЕ/мл. Готовят несколько последовательных разведений сыворотки, отличающихся по активности одно от другого на 10 – 20 %.

По 1 мл каждого разведения сыворотки переносят во флаконы, добавляют по 1,5 мл ботулинического токсина одноименного типа, содержащего 5 опытных доз. Полученные смеси осторожно перемешивают, избегая пенообразования и после выдерживания при температуре от 18 до 22 °С в течение (45 ± 1) мин вводят 4 белым мышам массой 16 – 18 г внутривенно в объеме 0,5 мл. За животными наблюдают 4 сут, отмечая клинику заболевания и число павших от ботулизма мышей.

Опыт сопровождают контролем опытной дозы токсина, для чего готовят смесь, содержащую 1 мл СО активности противоботулинической сыворотки соответствующего типа с исходной концентрацией 1 МЕ/мл и 1,5 мл токсина, содержащего 5 опытных доз. Смесь инкубируют при тех же условиях, что и испытуемую сыворотку и вводят ее внутривенно 4 белым мышам массой 16 – 18 г в объеме 0,5 мл. За животными наблюдают 4 сут, отмечая клинику заболевания и число мышей, павших от ботулизма.

Специфическую активность (титр) сыворотки рассчитывают, исходя из наибольшего ее разведения, которое в смеси с опытной дозой токсина обеспечивает защиту 100 % мышей от ботулизма. Тест не учитывают, если более 50 % мышей контрольной группы остались живы.

Удельная активность. Не менее 2000 МЕ на 0,1 г белка для противоботулинической сыворотки типа А, не менее 500 МЕ – для

противоботулинической сыворотки типа В, не менее 1000 МЕ – для противоботулинической сыворотки типа Е.

Расчет удельной активности (X) производят по формуле:

$$X = \frac{T}{C \cdot 10},$$

где: T – титр сыворотки, МЕ/мл;

C – концентрация белка, г/мл;

10 – постоянный коэффициент.

Сульфат-ионы. Не более 0,025 %. Определение проводят колориметрическим методом. К 5 мл испытуемого образца и 5 мл рабочего эталонного раствора прибавляют по 0,5 мл 5 % раствора бария хлорида и перемешивают. Через 15 мин пробы перемешивают и измеряют оптическую плотность суспензий при длине волны 540 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм против контрольного раствора, содержащего 5 мл образца и 0,5 мл воды очищенной, для эталонного раствора – вода очищенная (5 мл).

Испытание проводят в 2 повторностях. Для расчета используется среднее значение.

Расчет содержания сульфат-ионов (X) в процентах производят по формуле:

$$X = \frac{0{,}002\ \% \cdot A_{опыт}}{A_{эталон}},$$

где: $A_{опыт}$ – значение оптической плотности испытуемого образца;

$A_{эталон}$ – значение оптической плотности рабочего эталонного раствора.

Примечания.

1. Приготовление основного раствора калия сульфата (1 мг/мл сульфат-ионов). В мерной колбе вместимостью 1000 мл в воде очищенной растворяю 1,8140 г калия сульфата, высушенного до постоянной массы при температуре 100 – 105 °С, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 1 года.

2. Приготовление рабочего эталонного раствора калия сульфата (0,002 % сульфат-ионов). В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1 мл основного раствора калия сульфата, доводят водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

ФГБУ Федеральная электронная медицинская библиотека

Натрия хлорид. От 0,85 до 0,95 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение хлоридов методом обратного осадительного титрования в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Хлороформ. Не более 0,1 %. Определение проводят колориметрическим методом, основанным на способности хлороформа образовывать с резорцином в щелочной среде соединение хиноидной структуры, которое дает цветную реакцию.

В пробирки вносят по 0,1 мл испытуемого образца и образца сравнения (0,1 % раствор хлороформа), добавляют 0,9 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, 2 мл 20 % раствора натрия гидроксида, 1 мл 10 % раствора резорцина и перемешивают. Содержимое пробирок перемешивают и нагревают на кипящей водяной бане в течение 1 мин. Пробы осторожно охлаждают до температуры 15 – 18 ^{0}С, затем измеряют оптическую плотность окрашенного раствора при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 5 мм по сравнению с контрольным раствором, состоящим из 1 мл воды очищенной, 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и 2 мл 20 % раствора натрия гидроксида. Раствор резорцина в контрольный раствор не добавляют, т.к. продукты его окисления окрашиваются в зеленый цвет.

Расчет содержания хлороформа проводят путем сравнения оптической плотности испытуемого образца и образца сравнения (0,1 % раствор хлороформа).

Содержание хлороформа (X) в процентах в испытуемом образце вычисляют по формуле:

$$X = \frac{0{,}1 \cdot A\,\text{исп}}{A\,\text{ст}},$$

где $A_{\text{исп}}$ – значение оптической плотности испытуемого образца;

$A_{\text{ст}}$ – значение оптической плотности образца сравнения – 0,1 % раствора хлороформа.

Примечания.

1. Приготовление 0,1 % раствора хлороформа. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,1 мл хлороформа, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор используют через 24 часа.

2. Приготовление 10 % раствора резорцина. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 5 г резорцина, растворяют в 30 мл воды очищенной, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 ºС, если не указано иначе в нормативной документации. Замораживание не допускается.

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

Сыворотка противодифтерийная лошадиная	**ФС.3.3.1.0043.15** **Взамен ГФ X, ст. 609,** **ФС 42-3813-99**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на сыворотку противодифтерийную лошадиную, которая представляет собой иммуноглобулиновую фракцию сыворотки крови лошади, содержащую специфические антитела, нейтрализующие дифтерийный экзотоксин. Сыворотка противодифтерийная лошадиная предназначена для экстренной профилактики и лечения дифтерии.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство сыворотки дифтерийной лошадиной должно быть валидировано с целью подтверждения установленных требований, гарантирующих её качество и безопасность применения.

Сыворотку получают из плазмы крови лошадей, гипериммунизированных дифтерийным анатоксином. Для получения очищенной, концентрированной иммуноглобулиновой фракции плазмы крови лошади, содержащей антитела (антитоксины), нейтрализующие дифтерийный токсин, применяют методы солевого фракционирования, ферментолиза, мембранной фильтрации.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость с желтоватым оттенком, без осадка. Определение проводят визуально.

Федеральная электронная медицинская библиотека

Подлинность. Сыворотка должна нейтрализовывать действие дифтерийного токсина. Определение проводят, как описано в разделе «Специфическая активность».

Прозрачность. Показатель оптической плотности не должен превышать 0,05. Определение проводят фотометрическим методом в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей» при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 3 мм по сравнению с водой очищенной, если нет других указаний в нормативной документации.

Цветность. Показатель оптической плотности не должен превышать 0,15. Определение проводят фотометрическим методом в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей» при длине волны 400 нм в кювете с толщиной слоя 3 мм по сравнению с водой очищенной, если нет других указаний в нормативной документации.

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH. От 6,8 до 7,2. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Содержание белка. От 8 до 12 %. Определение проводят колориметрическим методом с биуретовым реактивом в соответствии с ОФС «Определение белка».

Стерильность. Должна быть стерильной. Испытания проводят методами прямого посева или мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность. Должна быть апирогенной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Вводят 1 мл неразведенной сыворотки на 1 кг массы кролика. В нормативной документации указывают допустимые пределы изменений температуры животных и тест-дозу.

Аномальная токсичность. Должна быть нетоксичной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность», если в нормативной документации нет других указаний.

Специфическая активность. Не менее 1500 МЕ (международных единиц) в 1 мл. Специфическую активность противодифтерийной сыворотки определяют в тесте нейтрализации дифтерийного токсина на морских свинках по методу Рёмера и выражают в МЕ/мл. (1 МЕ дифтерийного антитоксина – это специфически нейтрализующая активность антитоксической сыворотки в отношении дифтерийного токсина, которая содержится в определенном количестве международного стандартного образца, представляющего собой противодифтерийную лиофилизированную лошадиную сыворотку).

Определение опытной некротической дозы дифтерийного токсина. Опытная дермонекротическая доза ($Ln/_{50}$) дифтерийного токсина представляет собой наименьшее количество токсина, которое в смеси с 1/50 МЕ противодифтерийной сыворотки при внутрикожном введении морским свинкам в объеме 0,05 мл вызывает некроз кожи к 4 - 5 сут.

При определении $Ln/_{50}$ дифтерийного токсина используют стандартный образец (СО) активности противодифтерийной сыворотки, калиброванный в МЕ, который разводят 0,9 % раствором натрия хлорида с таким расчетом, чтобы в 1 мл раствора содержалось 2/5 МЕ (соответственно в 0,05 мл 1/50 МЕ). Готовят несколько (не менее 5) разведений дифтерийного токсина, различающихся между собой по активности на 10 – 20 %. Для разведения дифтерийного токсина используют 0,9 % раствор натрия хлорида.

За 1 сут до проведения теста участки кожи на боках морских свинок освобождают от шерсти и подшерстка, не допуская ее повреждения. Свинок черной масти и альбиносов не используют. При определении $Ln/_{50}$ дифтерийного токсина 1 морской свинке делают не более 4 инъекций.

Смешивают 1 мл противодифтерийной лошадиной сыворотки и 1 мл одного из разведений дифтерийного токсина. Смеси выдерживают при

температуре (37 ± 1) °С в течение (30 ± 1) мин и вводят по 0,1 мл внутрикожно не менее чем 2 морским свинкам массой (425 ± 25) г. Для инъекций используют шприцы с иглами, имеющими угол скоса не менее 30 °. Результаты реакции учитывают ежедневно в течение 5 сут. В зависимости от количества дифтерийного токсина, оставшегося не связанным с противодифтерийной сывороткой, на месте введения смеси токсина и сыворотки может возникнуть эритема, инфильтрат или некроз. При полной нейтрализации дифтерийного токсина антитоксином реакция на месте инъекции должна отсутствовать.

Определение специфической активности (титра) противодифтерийной сыворотки. Исходя из предполагаемой активности, сыворотку разводят 0,9 % раствором натрия хлорида до концентрации 0,4 МЕ/мл (2/5 МЕ в 1 мл). Готовят несколько разведений, отличающихся друг от друга по активности на 10 – 20 %.

По 1 мл каждого разведения сыворотки смешивают с 1 мл рабочего разведения дифтерийного токсина. Полученные смеси осторожно перемешивают, избегая пенообразования и после выдерживания при температуре (37 ± 1) °С в течение (30 ± 1) мин вводят 2 морским свинкам массой (425 ± 25) г подкожно в объеме 0,1 мл.

Для контроля опытной некротической дозы каждой морской свинке вводят 0,1 мл смеси, содержащей 1 $Ln/_{50}$ дифтерийного токсина и 1/50 МЕ стандартного образца активности противодифтерийной сыворотки. За животными наблюдают 5 сут, отмечая развитие кожных реакций.

Специфическую активность (титр) сыворотки следует рассчитывать по наибольшему ее разведению, которое при внутрикожном введении в смеси с дифтерийным токсином не вызывает у морских свинок кожной реакции к 4 – 5 сут.

Удельная активность. Не менее 1300 МЕ на 0,1 г белка. Удельную активность (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{T}{C \cdot 10},$$

где T – титр сыворотки, МЕ/мл;

C – концентрация белка, г/мл;

10 – постоянный коэффициент.

Сульфат-ионы. Не более 0,025 %. Определение проводят колориметрическим методом. К 5 мл испытуемого образца и к 5 мл рабочего эталонного раствора прибавляют по 0,5 мл 5 % раствора бария хлорида и перемешивают. Через 15 мин пробы перемешивают и измеряют оптическую плотность суспензий при длине волны 540 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм против контрольного раствора, содержащего 5 мл образца и 0,5 мл воды очищенной, для эталонного раствора – вода очищенная (5 мл).

Испытание проводят в 2 повторностях. Для расчета используется среднее значение.

Расчет содержания сульфат-ионов (X) в процентах проводят по формуле:

$$X = \frac{0{,}002\ \% \cdot A_{опыт}}{A_{эталон}},$$

где $A_{опыт}$ – значение оптической плотности испытуемого образца;

$A_{эталон}$ – значение оптической плотности рабочего эталонного раствора.

Примечания.

1. Приготовление основного раствора калия сульфата (1 мг/мл сульфат-ионов). В мерной колбе вместимостью 1000 мл в воде очищенной растворяю 1,8140 г калия сульфата, высушенного до постоянной массы при температуре 100 – 105 °С, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 1 года.

2. Приготовление рабочего эталонного раствора калия сульфата (0,002 % сульфат-ионов). В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1 мл основного раствора калия сульфата, доводят водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Натрия хлорид. От 0,85 до 0,95 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение хлоридов методом

обратного осадительного титрования в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Хлороформ. Не более 0,1 %. Определение проводят колориметрическим методом, основанным на способности хлороформа образовывать с резорцином в щелочной среде соединение хиноидной структуры, которое дает цветную реакцию.

В пробирки вносят по 0,1 мл испытуемого образца и образца сравнения (0,1 % раствор хлороформа), добавляют 0,9 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, 2 мл 20 % раствора натрия гидроксида, 1 мл 10 % раствора резорцина и перемешивают. Содержимое пробирок перемешивают и нагревают на кипящей водяной бане в течение 1 мин. Пробы осторожно охлаждают до температуры 15 – 18 ^{0}С, затем измеряют оптическую плотность окрашенного раствора при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 5 мм по сравнению с контрольным раствором, состоящим из 1 мл воды очищенной, 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и 2 мл 20 % раствора натрия гидроксида. Раствор резорцина в контрольный раствор не добавляют, т.к. продукты его окисления окрашиваются в зеленый цвет.

Расчет содержания хлороформа проводят путем сравнения оптической плотности испытуемого образца и образца сравнения (0,1 % раствор хлороформа).

Содержание хлороформа (X) в процентах в испытуемом образце вычисляют по формуле:

$$X = \frac{0{,}1 \cdot A_{\text{исп}}}{A_{\text{ст}}},$$

где $A_{\text{исп}}$ – значение оптической плотности испытуемого образца;

$A_{\text{ст}}$ – значение оптической плотности образца сравнения – 0,1 % раствора хлороформа.

Примечания.

1. Приготовление 0,1 % раствора хлороформа. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,1 мл хлороформа, доводят объем раствора

водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор используют через 24 часа.

2. Приготовление 10 % раствора резорцина. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 5 г резорцина, растворяют в 30 мл воды очищенной, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объём лекарственных форм для парентерального применения».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 ºС, если не указано иначе в нормативной документации. Замораживание не допускается.

.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Сыворотка противостолбнячная лошадиная	**ФС.3.3.1.0044.15** **Взамен ГФ X, ст. 611**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на сыворотку противостолбнячную лошадиную, представляющую собой иммуноглобулиновую фракцию сыворотки крови лошади, содержащую специфические антитела, нейтрализующие столбнячный токсин. Сыворотка противостолбнячная лошадиная применяется для экстренной профилактики и лечения столбняка.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство сыворотки противостолбнячной должно быть валидировано с целью подтверждения установленных требований, гарантирующих её качество и безопасность применения.

Сыворотку получают из плазмы крови лошадей, гипериммунизированных столбнячным анатоксином/токсином. Для получения очищенной концентрированной иммуноглобулиновой фракции плазмы крови лошади, содержащей антитела (антитоксины), нейтрализующие столбнячный экзотоксин, применяют методы солевого фракционирования, ферментолиза, мембранной фильтрации.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость с желтоватым оттенком, без осадка. Определение проводят визуально.

Федеральный ФЭМБ медицинская библиотека

Подлинность. Сыворотка должна нейтрализовывать действие столбнячного токсина. Определение проводят по разделу «Специфическая активность».

Прозрачность. Показатель оптической плотности не должен превышать 0,05. Определение проводят фотометрическим методом при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 3 мм, если нет других указаний в нормативной документации.

Цветность. Показатель оптической плотности не должен превышать 0,15. Определение проводят фотометрическим методом при длине волны 400 нм в кювете с толщиной слоя 3 мм, если нет других указаний в нормативной документации.

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH. От 6,8 до 7,2, если нет других указаний в нормативной документации. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Содержание белка. От 8 до 12 %, если нет других указаний в нормативной документации. Определение проводят колориметрическим методом с биуретовым реактивом в соответствии с ОФС «Определение белка».

Стерильность. Должна быть стерильной. Испытания проводят методами прямого посева или мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность. Должна быть апирогенной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность», если нет других указаний в нормативной документации. Указывают допустимые пределы изменения

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

температуры тела животных и тест-дозу. Если не указано иначе, вводят 1 мл неразведенной сыворотки на 1 кг массы кролика.

Аномальная токсичность. Должна быть нетоксичной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность», если в нормативной документации нет других указаний.

Специфическая активность. Не менее 1200 международных единиц (МЕ) в 1 мл. Специфическую активность противостолбнячной сыворотки определяют в тесте нейтрализации столбнячного токсина по методу Эрлиха и выражают в МЕ/мл (1 МЕ столбнячного антитоксина – это специфически нейтрализующая активность антитоксической сыворотки в отношении столбнячного токсина, которая содержится в определенном количестве международного стандартного образца, представляющего собой противостолбнячную лиофилизированную лошадиную сыворотку).

Определение опытной дозы столбнячного токсина. Опытная доза столбнячного токсина ($L+/_{100}$) представляет собой наименьшее количество токсина, которое в смеси с 0,01 МЕ противостолбнячной сыворотки при введении мышам в объеме 0,4 мл вызывает гибель 50 % мышей (с явлениями столбняка) на 4 сут.

Готовят несколько разведений столбнячного токсина, различающихся между собой на 10 – 20 %.

При определении опытной летальной дозы столбнячного токсина используют стандартный образец (СО) активности противостолбнячной сыворотки, калиброванный в МЕ по отношению к соответствующему международному стандартному образцу. СО разводят 0,9 % раствором натрия хлорида до концентрации 0,1 МЕ/мл. Готовят смеси, состоящие из 1 мл СО активности противостолбнячной лошадиной сыворотки, 2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и 1 мл одного из разведений столбнячного токсина. Смеси токсина с сывороткой осторожно перемешивают и инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (45 ± 1) мин, затем вводят по 0,4 мл 4

белым мышам массой (17 ± 1) г под кожу бедра. За животными наблюдают 4 сут. Отмечают разведение токсина, которое в смеси со СО активности противостолбнячной сыворотки вызвало гибель от столбняка 50 % животных.

Определение специфической активности (титра) противостолбнячной сыворотки. Исходя из предполагаемой активности, сыворотку разводят 0,9 % раствором натрия хлорида до концентрации 0,1 МЕ/мл. Готовят несколько разведений, отличающихся друг от друга по активности на 10 – 20 %.

По 1 мл каждого разведения испытуемой сыворотки переносят во флаконы, добавляют по 2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и 10 опытных доз столбнячного токсина в объеме 1 мл. Полученные смеси осторожно перемешивают, избегая пенообразования, и после выдерживания при температуре (37 ± 1) °С в течение (45 ± 1) мин вводят 4 белым мышам массой (17 ± 1) г под кожу бедра в объеме 0,4 мл.

Опыт сопровождают контролем опытной дозы токсина, для чего готовят смесь, содержащую 1 мл СО активности противостолбнячной сыворотки, разведенного до концентрации 0,1 МЕ/мл, 1 мл токсина, содержащего 10 опытных доз, и 2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Смесь инкубируют при тех же условиях, что и испытуемую сыворотку, и вводят ее 4 белым мышам массой (17 ± 1) г под кожу бедра в объеме 0,4 мл. За животными опытной и контрольной групп наблюдают 4 сут, отмечая количество павших от столбняка мышей.

Специфическую активность (титр) сыворотки рассчитывают, исходя из наибольшего ее разведения, которое в смеси с опытной дозой токсина обеспечивает защиту 100 % мышей от столбняка. Тест не учитывают, если все мыши в контрольной группе остались живы без признаков столбняка.

Удельная активность. Не менее 1000 МЕ на 0,1 г белка. Удельную активность (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{T}{C \cdot 10},$$

где: T – титр сыворотки, МЕ/мл;

C – концентрация белка, г/мл;

10 – постоянный коэффициент.

Сульфат-ионы. Не более 0,025 %. Определение проводят колориметрическим методом. К 5 мл испытуемого образца и 5 мл рабочего эталонного раствора прибавляют по 0,5 мл 5 % раствора бария хлорида и перемешивают. Через 15 мин пробы перемешивают и измеряют оптическую плотность суспензий при длине волны 540 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм против контрольного раствора, содержащего 5 мл образца и 0,5 мл воды очищенной, для эталонного раствора – вода очищенная (5 мл).

Испытание проводят в 2 повторностях. Для расчета используется среднее значение.

Расчет содержания сульфат-ионов (X) в процентах производят по формуле:

$$X = \frac{0{,}002\% \cdot A_{опыт}}{A_{эталон}},$$

где $A_{опыт}$ – значение оптической плотности испытуемого образца;

$A_{эталон}$ – значение оптической плотности рабочего эталонного раствора.

Примечания.

1. Приготовление основного раствора калия сульфата (1 мг/мл сульфат-ионов). В мерной колбе вместимостью 1000 мл в воде очищенной растворяю 1,8140 г калия сульфата, высушенного до постоянной массы при температуре 100 – 105 °С, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 1 года.

2. Приготовление рабочего эталонного раствора калия сульфата (0,002 % сульфат-ионов). В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1 мл основного раствора калия сульфата, доводят водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Натрия хлорид. От 0,85 до 0,95 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение хлоридов методом

обратного осадительного титрования в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Хлороформ. Не более 0,1 %. Определение проводят колориметрическим методом, основанным на способности хлороформа образовывать с резорцином в щелочной среде соединение хиноидной структуры, которое дает цветную реакцию.

В пробирки вносят по 0,1 мл испытуемого образца и образца сравнения (0,1 % раствор хлороформа), добавляют 0,9 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, 2 мл 20 % раствора натрия гидроксида, 1 мл 10 % раствора резорцина и перемешивают. Содержимое пробирок перемешивают и нагревают на кипящей водяной бане в течение 1 мин. Пробы осторожно охлаждают до температуры 15 – 18 ^{0}С, затем измеряют оптическую плотность окрашенного раствора при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 5 мм по сравнению с контрольным раствором, состоящим из 1 мл воды очищенной, 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и 2 мл 20 % раствора натрия гидроксида. Раствор резорцина в контрольный раствор не добавляют, т.к. продукты его окисления окрашиваются в зеленый цвет.

Расчет содержания хлороформа проводят путем сравнения оптической плотности испытуемого образца и образца сравнения (0,1 % раствор хлороформа).

Содержание хлороформа (X) в процентах в испытуемом образце вычисляют по формуле:

$$X = \frac{0{,}1 \cdot A\text{исп}}{A\,\text{ст}},$$

где: $A_{\text{исп}}$ – значение оптической плотности испытуемого образца;

$A_{\text{ст}}$ – значение оптической плотности образца сравнения – 0,1 % раствора хлороформа.

Примечания.

1. Приготовление 0,1 % раствора хлороформа. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,1 мл хлороформа, доводят объем раствора

водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор используют через 24 часа.

2. Приготовление 10 % раствора резорцина. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 5 г резорцина, растворяют в 30 мл воды очищенной, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объём лекарственных форм для парентерального применения».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 ºС, если в нормативной документации нет других указаний. Замораживание не допускается.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Сыворотка против яда змеи гадюки обыкновенной лошадиная	**ФС.3.3.1.0045.15 Взамен ГФ X, ст. 612, ФС 42-3070-98**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на сыворотку против яда змеи гадюки лошадиную, представляющую собой иммуноглобулиновую фракцию сыворотки лошади, содержащую специфические антитела, нейтрализующие яд змеи гадюки обыкновенной.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство сыворотки против яда змеи гадюки лошадиной должно быть валидировано с целью подтверждения установленных требований, гарантирующих качество и безопасность ее применения.

Сыворотку получают из плазмы крови лошадей, иммунизированных ядом змеи гадюки. Для получения очищенной, концентрированной иммуноглобулиновой фракции плазмы крови лошади, содержащей антитела, нейтрализующие яд змеи гадюки, применяют методы солевого фракционирования, ферментолиза, мембранной фильтрации.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость с желтоватым оттенком, без осадка. Определение проводят визуально.

Прозрачность. Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость. Показатель оптической плотности не должен превышать 0,05. Определение проводят фотометрическим методом при длине волны 540 нм в кювете

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

толщиной слоя 3 мм против контрольного раствора – воды очищенной, если нет других указаний в нормативной документации.

Цветность. Жидкость с желтоватым оттенком. Показатель оптической плотности не должен превышать 0,15. Определение проводят фотометрическим методом при длине волны 400 нм в кювете с толщиной слоя 3 мм по сравнению с контрольным раствором – водой очищенной, если нет других указаний в нормативной документации.

pH. От 6,8 до 7,2. Определение проводят методом потенциометрического титрования в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Подлинность. Сыворотка должна нейтрализовать действие яда змеи гадюки обыкновенной. Определение проводят, как описано в разделе «Специфическая активность».

Содержание белка. От 8 до 12 %. Определение проводят колориметрическим методом с биуретовым реактивом в соответствии с ОФС «Определение белка».

Стерильность. Должна быть стерильной. Испытания проводят методами прямого посева или мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность. Должна быть апирогенной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность», если нет других указаний в нормативной документации. Указывают допустимые пределы изменений температуры у животных и тест-дозу. Если не указано иначе, вводят 1 мл неразведенной сыворотки на 1 кг массы кролика.

Аномальная токсичность. Должна быть нетоксичной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность», если не указано иначе в нормативной документации.

Специфическая активность. Не менее 50 антитоксических единиц (АЕ) в 1 мл. Специфическую активность сыворотки устанавливают по ее способности нейтрализовать яд гадюки и выражают в антитоксических единицах (АЕ). За одну антитоксическую единицу принимают количество

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

сыворотки, которое в смеси с 3 LD_{50} яда гадюки защищает от гибели 50 % мышей, взятых в опыт (LD_{50} – доза яда гадюки, вызывающая гибель 50 % взятых в опыт животных в течение 2 сут).

Определение LD_{50} яда гадюки. Яд гадюки разводят в стерильном 0,9 % растворе натрия хлорида. Готовят 5–6 разведений, концентрация каждого из которых больше концентрации предшествующего в 1,1 или 1,2 раза (шаг разведений 1,1 или 1,2 соответственно). Разведения яда готовят таким образом, чтобы наибольшее разведение (содержащее наименьшее количество яда) не вызывало гибели, а наименьшее разведение с максимальной дозой токсина вызывало гибель 100 % мышей. Каждое разведение вводят мышам массой 16 – 18 г внутривенно в объеме 0,5 мл. За животными наблюдают в течение 2 сут, регистрируя количество павших животных. LD_{50} яда рассчитывают по формуле Кербера:

$$\lg LD_{50} = \lg D - \sigma (\Sigma L_i - 0{,}5),$$

где $\lg D$ – логарифм максимальной из испытанных доз яда;

L_i – отношение числа павших к общему числу мышей, получивших одно и то же разведение яда;

σ – логарифм шага разведений.

Определение специфической активности сыворотки против яда гадюки. Для разведения испытуемой сыворотки и яда используют стерильный 0,9 % раствор натрия хлорида.

Испытуемую сыворотку разводят так, чтобы, исходя из ее предполагаемой активности, получить несколько разведений, отличающихся одно от другого на 10 - 20 %. Яд гадюки разводят до содержания 10 LD_{50} в 1 мл (3 LD_{50} в 0,3 мл). Готовят смеси яда змеи и подготовленных разведений испытуемой сыворотки, в которых на 0,2 мл сыворотки должно приходиться 0,3 мл яда. Общий объем смеси должен быть достаточен для введения по 0,5 мл 5 – 6 мышам. Смеси яда и разведений сывороток инкубируют 45 мин при температуре (37 ± 0,5) °С и

вводят внутривенно в объеме 0,5 мл мышам массой 16 – 18 г. Каждый опыт сопровождают контролем активности яда змеи. Для контроля готовят не менее 3 доз яда, содержащих 0,75; 1,5; 3 LD_{50} в объеме 0,5 мл.

За животными наблюдают в течение 2 сут, регистрируя количество выживших в каждой группе.

Активность сыворотки рассчитывают по наибольшему ее разведению, которое при внутривенном введении мышам в смеси с 3 LD_{50} яда змеи обеспечивает защиту 50 % животных.

Удельная активность. Не менее 50 АЕ на 0,1 г белка. Удельную активность (X) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{T}{C \cdot 10},$$

где: T – титр сыворотки, МЕ/мл;

C – концентрация белка, г/мл;

10 – постоянный коэффициент.

Сульфат-ионы. Не более 0,025 %. Определение проводят колориметрическим методом. К 5 мл испытуемого образца и 5 мл рабочего эталонного раствора прибавляют по 0,5 мл 5 % раствора бария хлорида и перемешивают. Через 15 мин пробы перемешивают и измеряют оптическую плотность суспензий при длине волны 540 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм против контрольного раствора, содержащего 5 мл образца и 0,5 мл воды очищенной, эталонный раствор – вода очищенная (5 мл).

Испытание проводят в 2 повторностях. Для расчета используется среднее значение.

Расчет содержания сульфат-ионов в процентах производят по формуле:

$$X = \frac{0{,}002\,\% \cdot A\,\text{опыт}}{A\,\text{эталон}},$$

где $A_{\text{опыт}}$ – значение оптической плотности испытуемого образца;

$A_{\text{эталон}}$ – значение оптической плотности рабочего эталонного раствора.

Примечания.

ФЭБ Федеральная электронная медицинская библиотека

1. Приготовление основного раствора калия сульфата (1 мг/мл сульфат-ионов). В мерной колбе вместимостью 1000 мл в воде очищенной растворяю 1,8140 г калия сульфата, высушенного до постоянной массы при температуре 100 – 105 °С, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 1 года.

2. Приготовление рабочего эталонного раствора калия сульфата (0,002 % сульфат-ионов). В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1 мл основного раствора калия сульфата, доводят водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Натрия хлорид. От 0,85 до 0,95 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение хлоридов методом обратного осадительного титрования в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Хлороформ. Не более 0,1 %. Определение проводят колориметрическим методом, основанным на способности хлороформа образовывать с резорцином в щелочной среде соединение хиноидной структуры, которое дает цветную реакцию.

В пробирки вносят по 0,1 мл испытуемого образца и образца сравнения (0,1 % раствор хлороформа), добавляют 0,9 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, 2 мл 20 % раствора натрия гидроксида, 1 мл 10 % раствора резорцина и перемешивают. Затем пробирки нагревают на кипящей водяной бане в течение 1 мин. Пробы осторожно охлаждают до температуры 15–18 ^{0}С, измеряют оптическую плотность окрашенного раствора при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 5 мм по сравнению с контрольным раствором, состоящим из 1 мл воды очищенной, 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и 2 мл 20 % раствора натрия гидроксида. Раствор резорцина в контрольный раствор не добавляют, т.к. продукты его окисления окрашиваются в зеленый цвет.

Расчет содержания хлороформа проводят путем сравнения оптической плотности испытуемого образца и образца сравнения (0,1 % раствор хлороформа).

Содержание хлороформа (X) в процентах в испытуемом образце вычисляют по формуле:

$$X = \frac{0{,}1 \cdot A\,\text{исп}}{A\,\text{ст}},$$

где $A_{\text{исп}}$ – значение оптической плотности испытуемого образца;

$A_{\text{ст}}$ – значение оптической плотности образца сравнения – 0,1 % раствора хлороформа.

Примечания.

1. Приготовление 0,1 % раствора хлороформа. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,1 мл хлороформа, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор используют через 24 часа.
2. Приготовление 10 % раствора резорцина. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 5 г резорцина, растворяют в 30 мл воды очищенной, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения»

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С, если в нормативной документации нет других указаний. Замораживание не допускается.

Федеральная электронная медицинская библиотека

Сыворотка лошадиная, разведенная 1:100	**ФС.3.3.1.0046.15** **Взамен ФС 42-3813-99**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на сыворотку лошадиную, разведенную 1:100, представляющую собой иммуноглобулиновую фракцию сыворотки крови лошадей, разведенную 1:100, которая предназначена для определения чувствительности человека к белкам сыворотки лошади.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство сыворотки лошадиной должно быть валидировано с целью подтверждения установленных требований, гарантирующих её качество и безопасность применения.

Для получения сыворотки лошадиной, разведенной 1:100, антитоксические сыворотки, содержащие специфические антитела к дифтерийному, столбнячному, гангренозному или ботулиническим токсинам, разводят стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида в соотношении 1:100.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачная бесцветная жидкость. Определение проводят визуально.

Подлинность. Должна быть видоспецифична. Определение проводят с помощью иммунохимических методов, позволяющих подтвердить наличие в препарате белков крови лошади. Метод определения указывают в нормативной документации.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH. От 6,7 до 7,3. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Содержание белка. От 0,08 до 0,13 %. Определение проводят колориметрическим методом с биуретовым реактивом в соответствии с ОФС «Определение белка».

Стерильность. Должна быть стерильной. Испытания проводят методами прямого посева или мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность. Должна быть апирогенной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Вводят 1 мл сыворотки на 1 кг массы кролика. В нормативной документации указывают допустимые пределы изменений температуры животных.

Аномальная токсичность. Должна быть нетоксичной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

Сульфат-ионы. Не более 0,025 %. Определение проводят колориметрическим методом. К 5 мл испытуемого образца и 5 мл рабочего эталонного раствора прибавляют по 0,5 мл 5 % раствора бария хлорида и перемешивают. Через 15 мин пробы перемешивают и измеряют оптическую плотность суспензий при длине волны 540 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм против контрольного раствора, содержащего 5 мл образца и 0,5 мл воды очищенной, для эталонного раствора – вода очищенная (5 мл).

Испытание проводят в 2 повторностях. Для расчета используется среднее значение.

Расчет содержания сульфат-ионов (X) в процентах производят по формуле:

$$X = \frac{0{,}002\% \cdot A\text{опыт}}{A\text{эталон}},$$

где : $A_{опыт}$ – значение оптической плотности испытуемого образца; $A_{эталон}$ – значение оптической плотности рабочего эталонного раствора.

Примечания.

1. Приготовление основного раствора калия сульфата (1 мг/мл сульфат-ионов). В мерной колбе вместимостью 1000 мл в воде очищенной растворяю 1,8140 г калия сульфата, высушенного до постоянной массы при температуре 100 – 105 °С, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 1 года.

2. Приготовление рабочего эталонного раствора калия сульфата (0,002 % сульфат-ионов). В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1 мл основного раствора калия сульфата, доводят водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Натрия хлорид. От 0,85 до 0,95 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение хлоридов методом осадительного титрования в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Хлороформ. Не более 0,1 %. Определение проводят колориметрическим методом, основанным на способности хлороформа образовывать с резорцином в щелочной среде соединение хиноидной структуры, которое дает цветную реакцию. В пробирки вносят по 0,1 мл испытуемого образца и образца сравнения (0,1 % раствор хлороформа), добавляют 0,9 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, 2 мл 20 % раствора натрия гидроксида, 1 мл 10 % раствора резорцина и перемешивают. Содержимое пробирок перемешивают и нагревают на кипящей водяной бане в течение 1 мин. Пробы осторожно охлаждают до температуры 15 – 18 ^{0}С, затем измеряют оптическую плотность окрашенного раствора при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 5 мм по сравнению с контрольным раствором, состоящим из 1 мл воды очищенной, 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и 2 мл 20 % раствора натрия гидроксида. Раствор резорцина в контрольный раствор не добавляют, т.к. продукты его окисления окрашиваются в зеленый цвет. Расчет содержания хлороформа проводят путем сравнения оптической

плотности испытуемого образца и образца сравнения (0,1 % раствор хлороформа).

Содержание хлороформа (*X*) в процентах в испытуемом образце вычисляют по формуле:

$$X = \frac{0{,}1 \cdot A_{исп}}{A_{ст}},$$

где : $A_{исп}$ – значение оптической плотности испытуемого образца;

$A_{ст}$ – значение оптической плотности образца сравнения – 0,1 % раствора хлороформа.

Примечания.

1. Приготовление 0,1 % раствора хлороформа. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,1 мл хлороформа, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор используют через 24 часа.
2. Приготовление 10 % раствора резорцина. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 5 г резорцина, растворяют в 30 мл воды очищенной, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объём лекарственных форм для парентерального применения».

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 ºС, если в нормативной документации нет других указаний. Замораживание не допускается.

Федеральный центр электронной медицинской библиотеки

Пирогенал ,	**ФС.3.3.1.0047.15**
раствор для внутримышечного введения	**Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на пирогенал, раствор для внутримышечного введения, который представляет собой липополисахарид, выделенный из клеток *Salmonella typhi* и растворенный в фосфатно-солевом буферном растворе.

ПРОИЗВОДСТВО

Технология получения липополисахарида (ЛПС) предусматривает культивирование производственного штамма (штамма-продуцента) в полусинтетической питательной среде, инактивацию микробных клеток формалином, поэтапное выделение и очистку ЛПС ферментативными методами.

Производственный штамм *Salmonella typhi* Ty2 4446 должен обладать типичными морфологическими, культуральными, биохимическими свойствами:

- на плотной питательной среде (мясопептонный агар) должен образовывать круглые, гладкие, выпуклые, блестящие колонии (S-форма);
- на висмут-сульфитном агаре должен образовывать блестящие колонии черного цвета;
- в мазках, окрашенных по Граму, должны присутствовать грамотрицательные палочки с закругленными концами;
- должен ферментировать глюкозу, маннит и мальтозу с образованием кислоты без газа;

Федеральный Электронный Медицинский Институт

- должен продуцировать сероводород;

- не должен ферментировать лактозу и сахарозу;

- не должен образовывать индол;

- LD_{50} штамма при внутрибрюшинном заражении белых беспородных мышей должна быть не более $5 \cdot 10^7$ микробных клеток.

Основные этапы производства препарата

1) Получение биомассы и ее инактивация;

2) Концентрирование методом сепарирования;

3) Поэтапное выделение и очистка ЛПС ферментативными методами;

4) Получение готовой лекарственной формы препарата.

На этапе культивирования используют полусинтетическую питательную среду. Полученную биомассу проверяют на микробиологическую чистоту и типичность морфологии; проводят контроль биохимических свойств микроорганизмов; антигенные свойства проверяют в реакции агглютинации. Инактивацию микробных клеток проводят формалином, по окончании процесса инактивированную биомассу высевают на дифференциально-диагностическую питательную среду висмут-сульфитный агар для подтверждения отсутствия роста сальмонелл.

Инактивированную культуральную жидкость подвергают ферментативному гидролизу и сепарированию; из гидролизата ферментативными методами поэтапно выделяют ЛПС, а затем лиофилизируют, получая субстанцию-лиофилизат очищенного ЛПС. На стадии производства субстанцию испытывают по следующим показателям:

Описание. Порошок светло-кремового цвета. Определение проводят визуально.

Белок. Не более 3 %. Испытания проводят колориметрическим методом по методу Лоури в соответствии с ОФС «Определение белка колориметрическим методом (метод Лоури) в иммунобиологических

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

лекарственных препаратах»». Приготовление испытуемого образца ЛПС указывается в нормативной документации.

Нуклеиновые кислоты. Не более 5 %. Испытания проводят методом Спирина в соответствии с ОФС «Определение нуклеиновых кислот по методу Спирина в иммунобиологических лекарственных препаратах». Приготовление испытуемого образца липополисахарида указывается в нормативной документации.

Углеводы. От 40 до 60 %. Испытания проводят с антроновым реактивом в соответствии с ОФС «Определение сахаров спектрофотометрическим методом». Приготовление испытуемого образца ЛПС указывается в нормативной документации.

Безвредность. Препарат должен быть безвредным. Испытания проводят на 5 здоровых белых мышах массой (17 ± 1) г, которым внутрибрюшинно вводят 1 мл раствора ЛПС с концентрацией 100 мкг/мл; срок наблюдения за животными составляет 5 дней. Приготовление испытуемого образца ЛПС указывается в нормативной документации.

Оптическая плотность. Показания оптической плотности раствора ЛПС при 256 нм не должны превышать 0,300; при 280 нм – не более 0,200. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимых областях». Приготовление испытуемого образца ЛПС указывается в нормативной документации.

Потеря массы при высушивании. Не более 10 %. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Определение минимальной пирогенной дозы (МПД) рабочей серии ЛПС. Одна МПД должна составлять (0,0075 ± 0,0025) мкг ЛПС. Предварительно готовят раствор ЛПС в концентрации 100 мкг/мл, затем путем последовательных десятикратных разведений получают раствор с концентрацией 0,01 мкг/мл и из него – раствор с концентрацией 0,0075 мкг/мл (к 9 мл испытуемого образца с концентрацией 0,01 мкг/мл

прибавляют 3 мл 0,9 % раствора натрия хлорида). Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». За 1 ч до опыта у каждого кролика дважды с интервалом не менее 30 мин измеряют ректальную температуру. Различия в показаниях температуры у одного и того же животного не должны превышать 0,2 °С. Животным вводят раствор препарата с концентрацией 0,0075 мкг/мл внутривенно из расчета 1 мл на 1 кг массы тела. Средний показатель повышения температуры должен составлять от 0,6 до 0,8 °С.

В случае, если средний показатель повышения температуры будет ниже 0,6 °С, вводят раствор препарата с концентрацией 0,01 мкг/мл по 1 мл на 1 кг массы животного; если средний показатель повышения температуры будет выше 0,8 °С, вводят раствор препарата с концентрацией 0,005 мкг/мл по 1 мл на 1 кг массы животного. Повторный контроль проводят на том же количестве кроликов. Если при повторном испытании после введения растворов с концентрацией 0,01 или 0,005 мкг/мл средний показатель повышения температуры у животных составит ниже 0,6 °С или выше 0,8 °С соответственно, препарат бракуют. Минимальное количество вещества, вводимого внутривенно, на 1 кг массы кролика, вызывающее среднее повышение температуры тела на (0,6 – 0,8) °С, составляет минимальную пирогенную дозу (МПД). Одна МПД должна составлять (0,0075 ± 0,0025) мкг ЛПС.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачная бесцветная жидкость. Определение проводят визуально.

Подлинность. Препарат должен быть пирогенным. Одна минимальная пирогенная доза (МПД) должна составлять (0,0075 ± 0,0025) мкг ЛПС (раздел «Специфическая активность»).

Прозрачность. Должен быть прозрачным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Федеральная электронная медицинская библиотека

Цветность. Должен быть бесцветным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

pH. От 6,7 до 7,3. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

Стерильность. Должен быть стерильным. Определяют методом прямого посева в соответствии с ОФС «Стерильность».

Аномальная токсичность. Должен быть нетоксичным. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Мышам массой (15 ± 1) г вводят внутрибрюшинно тест-дозу препарата объемом 1 мл. Период наблюдения за животными составляет 5 сут.

Специфическая активность. При введении 1 МПД на 1 кг массы кролика средний показатель повышения температуры должен быть от 0,6 до 0,8 °С. Препарат, в зависимости от концентрации активного вещества, разводят стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида до концентрации 10 мкг/мл. Затем путем последовательных десятикратных разведений готовят раствор с концентрацией 0,01 мкг/мл и из него – раствор с концентрацией 0,0075 мкг/мл (к 9 мл раствора препарата с концентрацией 0,01мкг/мл прибавляют 3 мл раствора натрия хлорида 0,9 %). Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». За 1 ч до опыта у каждого кролика дважды с интервалом не менее 30 мин измеряют ректальную температуру. Различия в показаниях температуры у одного и того же животного не должны превышать 0,2 °С. Животным вводят раствор препарата с

концентрацией 0,0075 мкг/мл внутривенно из расчета 1 мл на 1 кг массы тела. Средний показатель повышения температуры должен составлять от 0,6 до 0,8 °С.

В случае, если средний показатель повышения температуры будет ниже 0,6 °С, вводят раствор препарата с концентрацией 0,01 мкг/мл по 1 мл на 1 кг массы животного; если средний показатель повышения температуры будет выше 0,8 °С, вводят раствор препарата с концентрацией 0,005 мкг/мл по 1 мл на 1 кг массы животного. Повторный контроль проводят на том же количестве кроликов. Если при повторном испытании после введения растворов с концентрацией 0,01 или 0,005 мкг/мл средний показатель повышения температуры у животных составит ниже 0,6 °С или выше 0,8 °С соответственно, препарат бракуют.

Минимальное количество вещества, вводимого внутривенно, на 1 кг массы кролика, вызывающее среднее повышение температуры тела на 0,6 – 0,8 °С составляет МПД. Одна МПД должна составлять (0,0075 ± 0,0025) мкг ЛПС.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С.

Федеральная электронная медицинская библиотека

Пирогенал,	**ФС.3.3.1.0048.15**
суппозитории ректальные	**Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на лекарственное средство пирогенал, суппозитории ректальные, которое представляет собой липополисахарид (ЛПС), выделенный из клеток *Salmonella typhi.*

ПРОИЗВОДСТВО

Технология получения ЛПС предусматривает культивирование производственного штамма (штамма-продуцента) в полусинтетической питательной среде, инактивацию микробных клеток формалином, поэтапное выделение и очистку ЛПС ферментативными методами.

Производственный штамм *Salmonella typhi* Ty2 4446 должен обладать типичными морфологическими, культуральными, биохимическими свойствами:

- на плотной питательной среде (мясопептонный агар) должен образовывать круглые, гладкие, выпуклые, блестящие колонии (S-форма);

- на висмут-сульфитном агаре должен образовывать блестящие колонии черного цвета;

- в мазках, окрашенных по Граму, должны присутствовать грамотрицательные палочки с закругленными концами;

- должен ферментировать глюкозу, маннит и мальтозу с образованием кислоты без газа;

- должен продуцировать сероводород;

- не должен ферментировать лактозу и сахарозу;

- не должен образовывать индол;

Федеральный электронный медицинский библиотека ФЭМБ

- LD_{50} штамма при внутрибрюшинном заражении белых беспородных мышей должна быть не более $5 \cdot 10^7$ микробных клеток.

Основные этапы производства препарата

1) Получение биомассы и ее инактивация;
2) Концентрирование методом сепарирования;
3) Поэтапное выделение и очистка ЛПС ферментативными методами;
4) Получение готовой лекарственной формы препарата.

На этапе культивирования используют полусинтетическую питательную среду. Полученную биомассу проверяют на микробиологическую чистоту и типичность морфологии; проводят контроль биохимических свойств микроорганизмов; антигенные свойства проверяют в реакции агглютинации. Инактивацию микробных клеток проводят формалином, по окончании процесса инактивированную биомассу высевают на дифференциально-диагностическую питательную среду висмут-сульфитный агар для подтверждения отсутствия роста сальмонелл.

Инактивированную культуральную жидкость подвергают ферментативному гидролизу и сепарированию; из гидролизата ферментативными методами поэтапно выделяют ЛПС, а затем лиофилизируют, получая субстанцию-лиофилизат очищенного ЛПС. На стадии производства субстанцию испытывают по следующим показателям:

Описание. Порошок светло-кремового цвета. Определение проводят визуально.

Белок. Не более 3 %. Испытания проводят колориметрическим методом по методу Лоури в соответствии с ОФС «Определение белка колориметрическим методом (метод Лоури) в иммунобиологических лекарственных препаратах». Приготовление испытуемого образца ЛПС указывается в нормативной документации.

Нуклеиновые кислоты. Не более 5 %. Испытания проводят методом Спирина в соответствии с ОФС «Определение нуклеиновых кислот по

методу Спирина в иммунобиологических лекарственных препаратах». Приготовление испытуемого образца ЛПС указывается в нормативной документации.

Углеводы. От 40 до 60 %. Испытания проводят с антроновым реактивом в соответствии с ОФС «Определение сахаров спектрофотометрическим методом». Приготовление испытуемого образца ЛПС указывается в нормативной документации.

Безвредность. Препарат должен быть безвредным. Испытания проводят на 5 здоровых белых мышах массой (17 ± 1) г, которым внутрибрюшинно вводят 1 мл раствора ЛПС с концентрацией 100 мкг/мл; срок наблюдения за животными составляет 5 дней. Приготовление испытуемого образца ЛПС указывается в нормативной документации.

Оптическая плотность. Показания оптической плотности раствора липополисахарида при 256 нм не должны превышать 0,300; при 280 нм – не более 0,200. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимых областях». Приготовление испытуемого образца ЛПС указывается в нормативной документации.

Потеря массы при высушивании. Не более 10 %. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Определение минимальной пирогенной дозы (МПД) рабочей серии ЛПС. Одна МПД должна составлять (0,0075 ± 0,0025) мкг ЛПС. Предварительно готовят раствор ЛПС в концентрации 100 мкг/мл, затем путем последовательных десятикратных разведений получают раствор с концентрацией 0,01 мкг/мл и из него – раствор с концентрацией 0,0075 мкг/мл (к 9 мл испытуемого образца с концентрацией 0,01 мкг/мл прибавляют 3 мл 0,9 % раствора натрия хлорида). Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». За 1 ч до опыта у каждого кролика дважды с интервалом не менее 30 мин измеряют ректальную температуру. Различия в показаниях температуры у одного и того же животного не

должны превышать 0,2 °С. Животным вводят раствор препарата с концентрацией 0,0075 мкг/мл внутривенно из расчета 1 мл на 1 кг массы тела. Средний показатель повышения температуры должен составлять от 0,6 до 0,8 °С.

В случае, если средний показатель повышения температуры будет ниже 0,6 °С, вводят раствор препарата с концентрацией 0,01 мкг/мл по 1 мл на 1 кг массы животного; если средний показатель повышения температуры будет выше 0,8 °С, вводят раствор препарата с концентрацией 0,005 мкг/мл по 1 мл на 1 кг массы животного. Повторный контроль проводят на том же количестве кроликов. Если при повторном испытании после введения растворов с концентрацией 0,01 или 0,005 мкг/мл средний показатель повышения температуры у животных составит ниже 0,6 °С или выше 0,8 °С соответственно, препарат бракуют. Минимальное количество вещества, вводимого внутривенно, на 1 кг массы кролика, вызывающее среднее повышение температуры тела на 0,6 – 0,8 °С составляет МПД. Одна МПД должна составлять (0,0075 ± 0,0025) мкг ЛПС.

Субстанцию - лиофилизат очищенного ЛПС используют для получения лекарственного препарата пирогенал, суппозитории ректальные.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Суппозитории желтовато-белого цвета однородной консистенции, цилиндрической формы с заостренным концом, диаметром не более 10 мм.

Подлинность. Должен быть пирогенным. Одна МПД должна составлять (0,0075 ± 0,0025) мкг ЛПС (раздел «Специфическая активность»).

Средняя масса и отклонение от средней массы. 1,6 г ± 5 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

Температура и время плавления. Не более 20 мин. Один суппозиторий, залитый 50 мл воды очищенной, подогретой до температуры

(37 ± 1) °С, помещенный в конической колбе вместимостью 100 мл в термостат при температуре (37 ± 1) °С, должен расплавиться в течение не более 20 мин.

Микробиологическая чистота. В 1 суппозитории допускается не более 300 колониеобразующих единиц (КОЕ) микробов-сапрофитов при отсутствии патогенных, условно-патогенных микроорганизмов и грибов. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

Безвредность. Должен быть безвредным. Для испытания отбирают 4 суппозитория. Испытуемые образцы помещают в пробирку вместимостью 20 мл и расплавляют на водяной бане при температуре 40 – 45 °С в течение 15 – 20 мин. Расплавленную массу вводят 5 беспородным белым мышам массой (15 ± 1) г по 1 мл внутрибрюшинно со скоростью 0,1 мл/с шприцем вместимостью 1 $см^3$. В течение 5 сут животные должны оставаться живыми. В случае гибели хотя бы 1 животного опыт повторяют на удвоенном количестве мышей. Если при повторном испытании мыши остались живы, препарат считают прошедшим испытание. В противном случае препарат бракуют.

Специфическая активность. Должен быть пирогенным. При введении 1 МПД на 1 кг массы кролика средний показатель повышения температуры должен составлять 0,6 – 0,8 °С. Для определения специфической активности берут 3 суппозитория. В коническую колбу вместимостью 500 мл наливают 295 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и доводят его до закипания. В раствор опускают 3 суппозитория и ставят колбу на разогретую магнитную мешалку. Экстракцию пирогенала из суппозиториев проводят в течение 60 мин при интенсивном перемешивании, чтобы жировой слой разбивался на мельчайшие капельки, затем содержимое отстаивают в течение 10 – 15 мин. В результате полученный раствор пирогенала считают разведенным в 100 раз, т.е. до 0,5; 1; 1,5; 2 мкг/мл в зависимости от исходного содержания пирогенала в 1 суппозитории. Далее

из нижнего слоя раствора делают разведение до 0,0075 мкг/мл. Трем кроликам вводят препарат в концентрации 0,0075 мкг/мл внутривенно из расчета 1 мл на 1 кг массы. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Средний показатель повышения температуры должен составлять 0,6 – 0,8 °С. Если повышение температуры будет ниже 0,6 °С или выше 0,8 °С, то испытуемый образец вводят повторно в концентрации 0,01 или 0,005 мкг/мл. Если при этом средний показатель повышения температуры будет ниже 0,6 °С или выше 0,8 °С, серию бракуют.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Плазма человека	**ФС.3.3.2.0001.15**
для фракционирования	**Взамен ФС 42-0091-02**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на плазму для фракционирования, представляющую собой жидкую часть крови человека, остающуюся после отделения клеточных элементов крови, заготовленной с антикоагулянтом. Плазму для фракционирования получают из цельной крови человека методами центрифугирования, афереза и др. Плазма человека для фракционирования не должна содержать антибактериальных и противогрибковых средств.

Плазма человека для фракционирования используется в качестве субстанции для производства препаратов крови человека.

Доноры. Для производства плазмы крови человека может быть использована плазма здоровых доноров, отобранных по результатам медицинского обследования, изучения медицинского анамнеза и лабораторного исследования крови в соответствии с требованиями действующих нормативных правовых актов.

Зарегистрированные данные должны обеспечить идентификацию и прослеживаемость донора, каждой единицы плазмы, включённой в пул, а также связанных с ними образцов для лабораторных исследований.

Индивидуальная единица плазмы. Индивидуальная единица плазмы подвергается обязательному тестированию на отсутствие поверхностного антигена вируса гепатита В, на антитела к вирусу гепатита С, антигены ВИЧ р24, антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, возбудителю сифилиса. Образцы плазмы с

Федеральная электронная медицинская библиотека

отрицательными результатами тестов иммуноферментного анализа объединяют в минипулы и подвергают исследованию на наличие нуклеиновых кислот вирусов иммунодефицита человека, вирусов гепатитов В и С. При положительных результатах тестов плазму таких доноров бракуют и уничтожают.

Плазма, предназначенная для выделения лабильных белков (факторов свёртывания крови), должна быть заморожена до температуры минус 25°С и ниже не позднее 24ч после донации.

Плазма, предназначенная для выделения стабильных белков (альбумин, иммуноглобулины), полученная аферезом, должна быть заморожена до температуры минус 20°С и ниже не позднее 24ч после донации, а полученная иными способами до температуры минус 20°С и ниже не позднее 72ч после донации.

Для заготовки крови и ее компонентов используют полимерные контейнеры одноразового применения, соответствующие установленным требованиям. Упаковка должна быть герметичной для исключения контаминации микроорганизмами.

Карантинизация. Индивидуальные единицы плазмы подвергаются карантинизации в соответствии с действующими нормативными правовыми актами. При выявлении у донора гемотрансмиссивных инфекций в период карантинизации или наличии в крови донора по истечении срока карантинизации специфических и неспецифических маркеров гемотрансмиссивных инфекций, замороженная плазма, заготовленная от донора, должна быть изолирована, подвергнута дезинфекции и утилизирована с обязательной регистрацией этой процедуры.

Перед формированием производственного пула (загрузки) индивидуальные единицы плазмы объединяют для проведения испытаний по показателям. При производстве препаратов крови производственный пул (загрузку) плазмы обязательно тестируют на антиген ВИЧ р24 и антитела к

ВИЧ-1, ВИЧ-2, на антитела к вирусу гепатита С, поверхностный антиген вируса гепатита В, возбудитель сифилиса методами иммуноферментного анализа и на наличие нуклеиновых кислот вирусов иммунодефицита человека, вирусов гепатитов В и С методом полимеразной цепной реакции.

Результаты тестирования производственного пула по вирусной безопасности плазмы должны быть отрицательными.

Количество объединяемых индивидуальных единиц плазмы указывают в фармакопейной статье.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. В замороженном состоянии – плотная затвердевшая масса желтоватого цвета. До замораживания и после размораживания (оттаивания) – прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость от светло-жёлтого до зеленоватого цвета. Не допускается наличие мути и хлопьев.

Примечание

Оттаивание индивидуальных единиц плазмы проводят при температуре (35-37)°С в течение 15 мин.

Подлинность (видоспецифичность). Подлинность плазмы для фракционирования подтверждают наличием только сывороточных белков крови человека. Испытание проводят с использованием сывороток против сывороточных белков крови человека, крупного рогатого скота, лошади и свиньи методом иммуноэлектрофореза в геле в соответствии с ОФС «Иммуноэлектрофорез в агаровом геле» или методом иммунодиффузии в геле в соответствии с ОФС «Иммунодиффузия в геле».

Гемпигменты. Оптическая плотность испытуемого раствора должна быть не более 0,25. Определение проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» в кюветах с толщиной слоя 10 мм при длине волны 403 нм относительно воды.

Примечание

Подготовка испытуемого образца. Испытуемый образец плазмы для фракционирования разводят 0,9 % раствором натрия хлорида в соотношении

1:4.

pH. От 6,5 до 7,5. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия», используя размороженную плазму.

Стерильность. Плазма должна быть стерильной. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Стерильность». Метод определения указывают в фармакопейной статье.

Содержание белка. Не менее 5 %. Определение проводят подходящим методом в соответствии с ОФС «Определение белка».

Специфическая активность. В плазме человека для фракционирования, используемой для производства препаратов иммуноглобулина человека нормального, указывают количественное содержание антибактериальных антител (минимум против одного возбудителя) и противовирусных антител (минимум против одного возбудителя), например, содержание антиальфастафилолизина должно быть не менее 0,5 МЕ/мл; содержание противокоревых антител должно быть не менее 1:80. Определение проводят по методике(ам), указанной(ым) в нормативной документации (например, содержание противокоревых антител – в реакции пассивной гемагглютинации, содержание антиальфастафилолизина – в реакции нейтрализации гемолитических свойств стафилококкового альфа-токсина) с использованием стандартных образцов.

В плазме для фракционирования, используемой для производства препаратов иммуноглобулинов человека специфического и специального назначения, указывают количественное содержание специфических антител. Например, в плазме для фракционирования, используемой для производства иммуноглобулина человека антистафилококкового содержание антиальфастафилолизина должно быть не менее 3 МЕ/мл в плазме для фракционирования, используемой для производства иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита содержание антител против вируса клещевого энцефалита должно быть не менее 1:10; в плазме человека для

фракционирования, используемой для производства иммуноглобулина человека против гепатита В содержание антител к поверхностному антигену (HBsAg) вируса гепатита В должно быть не менее 5 МЕ/мл и др. Определение проводят по методике(ам), указанной(ым) в нормативной документации с использованием стандартных образцов.

В плазме для фракционирования, используемой для производства препаратов факторов свертывания крови, проводят определение активности фактора VIII в соответствии с ОФС «Определение активности факторов свертывания крови». Активность фактора VIII должна быть не менее 0,7 МЕ/мл. Испытание проводят в объединенной пробе, содержащей не менее 10 индивидуальных единиц плазмы.

Вирусная безопасность

Поверхностный антиген (HBsAg) и нуклеиновая кислота вируса гепатита В. Должны отсутствовать. Определение проводят иммуноферментным методом и методом полимеразной цепной реакции с коммерческими тест-системами, разрешенными к применению в РФ, в соответствии с прилагаемыми к ним инструкциями.

Антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1, ВИЧ-2) и нуклеиновая кислота вируса иммунодефицита человека. Должны отсутствовать. Определение проводят иммуноферментным методом и методом полимеразной цепной реакции с коммерческими тест-системами, разрешенными к применению в РФ, в соответствии с прилагаемыми к ним инструкциями.

Антитела к вирусу гепатита С и нуклеиновая кислота вируса гепатита С. Должны отсутствовать. Определение проводят иммуноферментным методом и методом полимеразной цепной реакции с коммерческими тест-системами, разрешенными к применению в РФ, в соответствии с прилагаемыми к ним инструкциями.

ФЭМБ Федеральный электронный медицинский библиотеки

Антитела к возбудителю сифилиса. Плазма не должна содержать антител к возбудителю сифилиса. Определение проводят иммунологическим методом в реакции микропреципитации с коммерческими диагностическими наборами или иммуноферментным методом с коммерческими тест-системами, разрешенными к применению в РФ, в соответствии с прилагаемыми к ним инструкциями.

Упаковка и маркировка. Первичная упаковка (полимерные контейнеры одноразового применения) должна быть герметичной, обеспечивать сохранение заявленных свойств плазмы в течение регламентированного срока годности и разрешена к применению для упаковки лекарственных средств.

На этикетке упаковки указывают наименование и адрес организации донорства крови и ее компонентов, идентификационный номер донации, группу крови АВО и резус-фактор, дату донации, дату производства единицы плазмы (в случае, когда не совпадает с датой донации), дату окончания срока хранения, наименование и объем антикоагулянта и (или) добавочного раствора, наименование компонента крови, объем или массу крови либо компонентов крови, условия хранения, указание на дополнительную обработку (облучение, фильтрацию, инактивацию), надпись: «Антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, к вирусу гепатита С и поверхностный антиген вируса гепатита В отсутствуют».

Хранение. Хранят при температуре минус 30°С и ниже.

Транспортирование. Осуществляется при температуре минус 25°С и ниже в специальных рефрижераторах (камерах, модулях), оборудованных датчиками и регистрирующими температуру устройствами.

Фактор свертывания крови VII человека	**ФС.3.3.2.0002.15 Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на препараты фактора свертывания крови VII человека, полученные из плазмы крови человека для фракционирования.

Фактор свертывания крови VII человека представляет собой белковую фракцию плазмы крови человека, содержащую одноцепочечный гликопротеиновый фактор свертывания крови VII и небольшие количества активированной формы двухцепочечного производного фактора VIIa.

Препараты фактора свертывания крови VII человека могут содержать факторы свертывания II, IX, X, протеин C и протеин S, содержание которых определяют в готовом препарате. Препараты фактора свертывания крови VII человека не содержат консерванты и антибиотики.

ПРОИЗВОДСТВО

Для производства препаратов фактора свертывания крови VII человека используют плазму крови здоровых доноров, соответствующую требованиям ФС «Плазма человека для фракционирования».

Технология производства включает стадии удаления или инактивации инфекционных агентов. Если для инактивации вирусов в производстве используют химические соединения, их концентрация должна быть снижена до уровня, не влияющего на безопасность препарата для пациентов. В процессе производства не используют антимикробные консерванты. Метод производства должен обеспечивать отсутствие возможности активации тромбинообразующих факторов свертывания крови.

Препарат может содержать стабилизаторы (альбумин, полисорбат, натрия хлорид, натрия цитрат, кальция хлорид, глицин, лизин, гепарин, антитромбин и др.). Активность фактора VII должна составлять не менее 2 МЕ на мг белка до внесения стабилизаторов белковой природы. Раствор препарата методом стерилизующей фильтрации асептически расфасовывают в первичную упаковку, лиофилизируют и укупоривают под вакуумом или в атмосфере инертного газа.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Препарат представляет собой аморфную гигроскопичную массу в виде таблетки или порошка белого или бледно-желтого цвета (если в нормативной документации нет других указаний). Определение проводят визуально.

Подлинность

Видоспецифичность. Подтверждают наличием только сывороточных белков крови человека. Испытание проводят методом иммуноэлектрофореза в геле с использованием сывороток против сывороточных белков крови человека, крупного рогатого скота, лошади и свиньи в соответствии с ОФС «Иммуноэлектрофорез в агаровом геле». Допустимо проведение испытания методом иммунодиффузии в геле в соответствии с ОФС «Иммунодиффузия в геле». В результате испытания должны выявляться линии преципитации только с сывороткой против сывороточных белков крови человека.

Фактор VII. Подтверждают наличием активности фактора VII. Испытание проводят хромогенным или коагулометрическим методом. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение активности факторов свертывания крови».

Время получения восстановленного препарата. Не более 10 мин (если в нормативной документации нет других указаний). Приводят описание методики с указанием применяемого растворителя, его объема и условий растворения (температура растворителя, необходимость перемешивания и др.).

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Вода. Не более 2%. Определение проводят методом К.Фишера в соответствии с ОФС «Определение воды» (если в нормативной документации нет других указаний). Метод определения и необходимое для испытаний количество образца указывают в нормативной документации.

Механические включения. Видимые механические включения должны отсутствовать. Определение проводят в соответствии с ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах». В нормативной документации указывают название растворителя, описывают методику восстановления и (при необходимости) подготовки препарата.

pH. от 6,5 до 7,5. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Осмоляльность. Не менее 240 мОсм/кг. Определение проводят в соответствии с ОФС «Осмолярность».

Белок. Количественное содержание белка в расчете на флакон или мл восстановленного раствора указывают в нормативной документации. Определение проводят подходящим методом в соответствии с ОФС «Определение белка».

Гепарин (для препаратов, содержащих гепарин). Не более 0,5 МЕ на 1 МЕ фактора свертывания крови VII. Определение проводят хромогенным методом в соответствии с ОФС «Определение активности факторов свертывания крови».

Тромбин. Должен отсутствовать. Определение проводят коагулометрическим методом в соответствии с ОФС «Определение активности факторов свертывания крови» (тест на отсутствие тромбина).

Активированные факторы свертывания крови. Для каждого из разведений(1:10, 1:100) время свертывания должно составлять не менее 150 С. Определение проводят коагулометрическим методом в соответствии с ОФС «Определение активности факторов свертывания крови».

Активность фактора свертывания крови VII человека. Не менее 15 МЕ на мл восстановленного препарата. Определение проводят хромогенным методом или коагулометрическим методом в соответствии с ОФС «Определение активности факторов свертывания крови».

Специфическая активность Должна составлять не менее 2 МЕ на мг белка (при отсутствии стабилизаторов белковой природы).

Специфическую активность препарата рассчитывают по формуле:

$$\text{Специфическая активность} = \frac{\text{Активность фактора свертывания крови VII}}{\text{Содержание белка}}$$

специфическая активность = активность фактора свертывания крови VII / содержание белка

Активность фактора свертывания крови II. Активность фактора свертывания крови II в расчете на флакон или мл восстановленного раствора указывают в нормативной документации. Определение проводят хромогенным или коагулометрическим методом в соответствии с ОФС «Определение активности факторов свертывания крови».

Активность фактора свертывания крови IX. Активность фактора свертывания крови IX в расчете на флакон или мл восстановленного раствора указывают в нормативной документации. Определение проводят коагулометрическим методом в соответствии с ОФС «Определение активности факторов свертывания крови».

Примечание

Для испытаний готовят восстановленный раствор препарата (методику восстановления указывают в нормативной документации производителя). При наличии в препарате гепарина его нейтрализуют добавлением протамина сульфата из расчета 10 мкг протамина сульфата на 1 МЕ гепарина.

Активность фактора свертывания крови X. Активность фактора свертывания крови X в расчете на флакон или мл восстановленного раствора указывают в нормативной документации. Определение проводят хромогенным или коагулометрическим методом в соответствии с ОФС «Определение активности факторов свертывания крови».

Стабилизатор(ы). Проводят количественное определение вносимого(ых) в препарат стабилизатора(ов) в соответствии с ОФС «Газовая

хроматография» и/или ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», если в нормативной документации нет других указаний.

Допустимый предел содержания стабилизатора(ов) должен быть указан в нормативной документации.

Вирусинактивирующие агенты. Проводят количественное определение остаточного содержания в препарате вирусинактивирующего(их) агента(ов) в соответствии с ОФС «Газовая хроматография» и/или ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», если в нормативной документации нет других указаний. Допустимый предел содержания вирусинактивирующего(их) агента(ов) должен быть указан в нормативной документации.

Стерильность. Препарат должен быть стерильным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность или актериальные эндотоксины. Должен быть апирогенным или содержать бактериальные эндотоксины в количестве не более 0,1 ЕЭ на 1 МЕ фактора свертывания крови VII.

Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность» (не менее 30 МЕ фактора свертывания крови VII на 1 кг массы животного; объем вводимого препарата не должен превышать 10 мл на 1 кг массы животного) или с ОФС «Бактериальные эндотоксины» методом, указанным в нормативной документации.

Вирусная безопасность

Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg). Препарат не должен содержать поверхностного антигена вируса гепатита В. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих чувствительность не ниже 0,1 МЕ/мл в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу гепатита С. Антитела к вирусу гепатита С должны отсутствовать. Определение проводят иммуноферментным методом с

Федеральный электронный медицинский библиотека ФЭМБ

использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих 100 % чувствительность и специфичность в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Препарат не должен содержать антител к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих 100% чувствительность и специфичность в соответствии с инструкциями по применению.

Упаковка и маркировка. В соответствии ОФС «Лекарственные препараты из плазмы крови человека».

Хранение. Хранят в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8°С, если нет других указаний в нормативной документации.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Фактор свертывания крови VIII человека	**ФС.3.3.2.0003.15 Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на препараты фактора свертывания крови VIII человека, полученные из плазмы крови человека для фракционирования.

Фактор свертывания крови VIII человека является препаратом белковой фракции крови человека, содержащим гликопротеиновый комплекс фактора свертывания крови VIII и, в зависимости от метода получения, различные количества фактора Виллебранда.

Активность препарата после восстановления в условиях, указанных на этикетке, должна быть не менее 20 МЕ фактора VIII в 1 мл.

ПРОИЗВОДСТВО

Для производства препаратов фактора свертывания крови VIII человека используется плазма крови здоровых доноров, соответствующая требованиям ФС «Плазма человека для фракционирования». Технология производства включает стадии удаления или инактивации инфекционных агентов. Если для инактивации вирусов в производстве используют химические соединения, их концентрация должна быть снижена до уровня, не влияющего на безопасность препарата для пациентов. В процессе производства не используются антимикробные консерванты. Препарат может содержать стабилизаторы (альбумин, полисорбат, натрия хлорид, натрия цитрат, кальция хлорид, глицин, лизин и др.). Раствор препарата методом стерилизующей фильтрации асептически расфасовывают в первичную упаковку, лиофилизируют и укупоривают под вакуумом или в атмосфере инертного газа.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Белый или бледно-желтый порошок или рыхлое твердое вещество. Определение проводят визуально.

Подлинность

Видоспецифичность. Подтверждают наличием только сывороточных белков крови человека. Испытание проводят методом иммуноэлектрофореза в геле с использованием сывороток против сывороточных белков крови человека, крупного рогатого скота, лошади и свиньи в соответствии с ОФС «Иммуноэлектрофорез в агаровом геле». Допустимо проведение испытания методом иммунодиффузии в геле в соответствии с ОФС «Иммунодиффузия в геле». В результате испытания должны выявляться линии преципитации только с сывороткой против сывороточных белков крови человека.

Фактор VIII. Подтверждают наличием активности фактора VIII. Испытание проводят хромогенным или коагулометрическим методом. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение активности факторов свертывания крови».

Время получения восстановленного препарата. Не более 10 мин (если в нормативной документации нет других указаний). Приводят описание методики с указанием применяемого растворителя, его объема и условий растворения (температура растворителя, необходимость перемешивания и др.).

Вода. Не более 2 %. Определение проводят методом К.Фишера в соответствии с ОФС «Определение воды» (если в нормативной документации нет других указаний). Метод определения и необходимое для испытаний количество образца указывают в нормативной документации.

Механические включения. Видимые механические включения должны отсутствовать. Определение проводят в соответствии с ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах». В нормативной документации указывают название растворителя, описывают методику восстановления и

(при необходимости) подготовки препарата.

pH. От 6,5 до 7,5. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Осмоляльность. Не менее 240 мОсм/кг. Определение проводят в соответствии с ОФС «Осмолярность».

Белок. Количественное содержание белка в расчете на флакон или мл восстановленного раствора указывают в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение белка».

Активность фактора свертывания крови VIII. Активность фактора свертывания крови VIII в расчете на флакон или мл восстановленного раствора указывают в нормативной документации. Определение проводят коагулометрическим методом в соответствии с ОФС «Определение активности факторов свертывания крови».

Фактор Виллебранда. Активность фактора свертывания Виллебранда в расчете на флакон или мл восстановленного раствора указывают в нормативной документации. Определение проводят методом агглютинации или иммуноферментным методом в соответствии с ОФС «Определение активности факторов свертывания крови».

Стабилизатор(ы). Проводят количественное определение вносимого(ых) в препарат стабилизатора(ов) в соответствии с ОФС «Газовая хроматография» и/или ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», если в нормативной документации нет других указаний.

Допустимый предел содержания стабилизатора(ов) должен быть указан в нормативной документации.

Вирусинактивирующие агенты. Проводят количественное определение остаточного содержания в препарате вирусинактивирующего(их) агента(ов) в соответствии с ОФС «Газовая хроматография» и/или ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», если в нормативной документации нет других указаний. Допустимый предел содержания вирусинактивирующего(их) агента(ов) должен быть указан в нормативной документации.

Стерильность. Препарат должен быть стерильным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность или бактериальные эндотоксины. Должен быть апирогенным или содержать бактериальные эндотоксины в количестве не более 0,03 ЕЭ на 1 МЕ активности фактора свертывания крови VIII.

Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность» (тест-доза– не менее 50 МЕ фактора свертывания крови VIII на 1 кг массы животного) или в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины» методом, указанным в нормативной документации.

Вирусная безопасность

Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg). Препарат не должен содержать поверхностного антигена вируса гепатита В. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих чувствительность не ниже 0,1 МЕ/мл в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу гепатита С. Антитела к вирусу гепатита С должны отсутствовать. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих 100% чувствительность и специфичность в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Препарат не должен содержать антител к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих 100% чувствительность и специфичность в соответствии с инструкциями по применению.

Упаковка и маркировка. В соответствии ОФС «Лекарственные препараты из плазмы крови человека».

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Хранение. Хранят в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С, если нет других указаний в нормативной документации.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Фактор свертывания крови IX человека **ФС.3.3.2.0004.15**

Вводится впервые

Настоящая фармакопейная статья распространяется на препараты фактора свертывания крови IX человека, полученные из плазмы крови человека для фракционирования.

Фактор свертывания крови IX человека является препаратом белковой фракции крови человека, полученным из плазмы для фракционирования методом, эффективно отделяющим фактор IX от других факторов протромбинового комплекса (II, VII, X).

Активность препарата после восстановления в условиях, указанных на этикетке, должна быть не менее 20 МЕ фактора IX в 1 мл.

ПРОИЗВОДСТВО

Для производства препаратов фактора свертывания крови IX человека используется плазма крови здоровых доноров, соответствующая требованиям ФС «Плазма человека для фракционирования».

Технология производства включает стадии удаления или инактивации инфекционных агентов. Если для инактивации вирусов в производстве используют химические соединения, их концентрация должна быть снижена до уровня, не влияющего на безопасность препарата для пациентов.

Препарат может содержать стабилизаторы (альбумин, антитромбин III, полисорбат-80, натрия хлорид, натрия цитрат, глицин и др.). Специфическую активность (не менее 50 МЕ/мг общего белка) определяют до добавления любого белка-стабилизатора.

В процессе производства не используются антимикробные консерван-

ты. Раствор препарата методом стерилизующей фильтрации асептически расфасовывают в первичную упаковку, лиофилизируют и укупоривают под вакуумом или в атмосфере инертного газа.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Белый или бледно-желтый порошок или рыхлое твердое вещество (если в нормативной документации нет других указаний). Определение проводят визуально.

Подлинность

Видоспецифичность. Подтверждают наличием только сывороточных белков крови человека. Испытание проводят методом иммуноэлектрофореза в геле с использованием сывороток против сывороточных белков крови человека, крупного рогатого скота, лошади и свиньи в соответствии с ОФС «Иммуноэлектрофорез в агаровом геле». Допустимо проведение испытания методом иммунодиффузии в геле в соответствии с ОФС «Иммунодиффузия в геле». В результате испытания должны выявляться линии преципитации только с сывороткой против сывороточных белков крови человека.

Фактор IX. Подтверждают наличием активности фактора IX. Определение проводят коагулометрическим или хромогенным методом в соответствии с ОФС «Определение активности факторов свертывания крови».

Время получения восстановленного препарата. Не более 10 мин (если в нормативной документации нет других указаний). Приводят описание методики с указанием применяемого растворителя, его объема и условий растворения (температура растворителя, необходимость перемешивания и др.).

Вода. Не более 2 %. Определение проводят методом К. Фишера в соответствии с ОФС «Определение воды» (если в нормативной документации нет других указаний). Метод определения и необходимое для испытаний количество образца указывают в нормативной документации.

Механические включения. Видимые механические включения должны отсутствовать. Определение проводят в соответствии с ОФС «Видимые

механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах». В нормативной документации указывают название растворителя, описывают методику восстановления и (при необходимости) подготовки препарата.

pH. От 6,5 до 7,5. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Осмоляльность. Не менее 240 мОсм/кг. Определение проводят в соответствии с ОФС «Осмолярность».

Белок. Количественное содержание белка в расчете на флакон или мл восстановленного раствора указывают в нормативной документации. Определение проводят подходящим методом в соответствии с ОФС «Определение белка».

Активность фактора свертывания крови IX. Активность фактора свертывания крови IX в расчете на флакон или мл восстановленного раствора указывают в нормативной документации. Определение проводят хромогенным или коагулометрическим методом в соответствии с ОФС «Определение активности факторов свертывания крови».

Активированные факторы свертывания. Время свертывания разведений препарата 1:10 и 1:100 должно составлять не менее 150 с. Определение проводят коагулометрическим методом в соответствии с ОФС «Определение активности факторов свертывания крови».

Стабилизатор(ы). Проводят количественное определение вносимого(ых) в препарат стабилизатора(ов) в соответствии с ОФС «Газовая хроматография» и/или ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», если в нормативной документации нет других указаний.

Допустимый предел содержания стабилизатора(ов) должен быть указан в нормативной документации.

Вирусинактивирующие агенты. Проводят количественное определение остаточного содержания в препарате вирусинактивирующего(их) агента(ов) в соответствии с ОФС «Газовая хроматография» и/или ОФС «Высоко-

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

эффективная жидкостная хроматография», если в нормативной документации нет других указаний. Допустимый предел содержания вирусинактивирующего(их) агента(ов) должен быть указан в нормативной документации.

Стерильность. Препарат должен быть стерильным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность или бактериальные эндотоксины. Должен быть апирогенным или содержать бактериальные эндотоксины в количестве не более 0,03 ЕЭ на 1 МЕ фактора свертывания крови IX.

Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность» (не менее 50 МЕ фактора свертывания крови IX на 1 кг массы животного) или в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины» методом, указанным в нормативной документации.

Вирусная безопасность

Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg). Препарат не должен содержать поверхностного антигена вируса гепатита В. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих чувствительность не ниже 0,1 МЕ/мл в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу гепатита С. Антитела к вирусу гепатита С должны отсутствовать. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих 100% чувствительность и специфичность в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Препарат не должен содержать антител к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих

100% чувствительность и специфичность в соответствии с инструкциями по применению.

Упаковка и маркировка. В соответствии ОФС « Лекарственные препараты из плазмы крови человека».

Хранение. Хранят в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С, если нет других указаний в нормативной документации.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Фактор Виллебранда **ФС.3.3.2.0005.15**

Вводится впервые

Настоящая фармакопейная статья распространяется на препараты фактора Виллебранда, представляющие собой белковую фракцию плазмы крови человека, содержащую гликопротеиновый фактор Виллебранда с различным количеством фактора свертывания крови VIII человека. Препараты фактора Виллебранда не содержат консерванты и антибиотики.

ПРОИЗВОДСТВО

Для производства препаратов фактора Виллебранда используют плазму крови здоровых доноров, соответствующую требованиям ФС «Плазма человека для фракционирования».

Технология производства включает стадии удаления или инактивации инфекционных агентов. Если для инактивации вирусов в производстве используют химические соединения, их концентрация должна быть снижена до уровня, не влияющего на безопасность препарата для пациентов. Метод производства должен обеспечивать получение препарата с постоянным составом в отношении фактора Виллебранда, фактора свертывания крови VIII и их соотношения. Производство должно обеспечивать получение препарата с охарактеризованным распределением различных полимеров фактора Виллебранда и постоянным соотношением активности фактора Виллебранда к содержанию антигена фактора Виллебранда. В процессе производства не используют антимикробные консерванты.

Активность фактора Виллебранда в препарате должна составлять не

менее 1 МЕ на 1мг белка до внесения стабилизаторов белковой природы.

Раствор препарата методом стерилизующей фильтрации асептически расфасовывают в первичную упаковку, лиофилизируют и укупоривают под вакуумом или в атмосфере инертного газа.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Препарат представляет собой аморфную гигроскопичную массу в виде таблетки или порошка белого или бледно-желтого цвета (если в нормативной документации нет других указаний). Определение проводят визуально.

Подлинность

Видоспецифичность. Подтверждают наличием только сывороточных белков крови человека. Испытание проводят методом иммуноэлектрофореза в геле с использованием сывороток против сывороточных белков крови человека, крупного рогатого скота, лошади и свиньи в соответствии с ОФС «Иммуноэлектрофорез в агаровом геле». Допустимо проведение испытания методом иммунодиффузии в геле в соответствии с ОФС «Иммунодиффузия в геле». В результате испытания должны выявляться линии преципитации только с сывороткой против сывороточных белков крови человека.

Фактор Виллебранда. Подтверждают наличием активности фактора Виллебранда. Испытание проводят методом агглютинации или иммуноферментным методом в соответствии с ОФС «Определение активности факторов свертывания крови».

Примечание

При внесении в препарат таких стабилизаторов, как альбумин, определяют их подлинность.

Время получения восстановленного препарата. Не более 10 мин (если в нормативной документации нет других указаний). Приводят описание методики с указанием применяемого растворителя, его объема и условий растворения (температура растворителя, необходимость перемешивания и др.).

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

Вода. Не более 2%. Определение проводят методом К.Фишера в соответствии с ОФС «Определение воды» (если в нормативной документации нет других указаний). Метод определения и необходимое для испытаний количество образца указывают в нормативной документации.

Механические включения. В восстановленном растворе видимые механические включения должны отсутствовать. Определение проводят в соответствии с ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах». Указывают название растворителя, описывают методику восстановления препарата и необходимость его фильтрации через прилагаемый фильтр.

pH. От 6,5 до 7,5. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Осмоляльность. Не менее 240 мОсм/кг. Определение проводят в соответствии с ОФС «Осмолярность».

Белок. Количественное содержание белка в расчете на 1 флакон или 1 мл восстановленного раствора указывают в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение белка».

Анти-А и анти-В гемагглютинины. Агглютинация должна отсутствовать в разведении препарата 1:64. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение анти-А и анти-В гемагглютининов в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека».

Примечание.

Подготовка испытуемого образца. Восстановленный препарат разводят 0,9 % раствором натрия хлорида или буферным раствором низкой ионной силы (LISS) до содержания фактора Виллебранда 6 МЕ/мл.

Активность фактора Виллебранда. Не менее 20 МЕ на 1мл восстановленного препарата. Определение проводят методом агглютинации или иммуноферментным методом в соответствии с ОФС «Определение активности факторов свертывания крови».

Активность фактора свертывания крови VIII человека. Активность фактора свертывания крови VIII в расчете на 1 флакон или 1 мл

восстановленного раствора указывают в нормативной документации. Определение активности фактора VIII проводят в тех случаях, когда его содержание в препарате более 10 МЕ фактора VIII в 100 МЕ активности фактора Виллебранда.

Определение проводят хромогенным или коагулометрическим методом в соответствии с ОФС «Определение активности факторов свертывания крови».

Стабилизатор(ы). Проводят количественное определение вносимого(ых) в препарат стабилизатора(ов) методом(ами) в соответствии с ОФС «Газовая хроматография» и/или ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», если в нормативной документации нет других указаний. Допустимый предел содержания стабилизатора(ов) должен быть указан в нормативной документации.

Вирусинактивирующие агенты. Проводят количественное определение остаточного содержания в препарате вирусинактивирующего(их) агента(ов) в соответствии с ОФС «Газовая хроматография» и/или ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», если в нормативной документации нет других указаний. Допустимый предел содержания вирусинактивирующего(их) агента(ов) должен быть указан в нормативной документации.

Стерильность. Препарат должен быть стерильным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность или бактериальные эндотоксины. Должен быть апирогенным или содержать бактериальные эндотоксины в количестве не более 0,05 МЕ эндотоксинов в 1 МЕ активности фактора Виллебранда.

Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность» (не менее 100 МЕ фактора Виллебранда на 1 кг массы животного; объем вводимого препарата не должен превышать 1 мл на 1 кг массы животного) или испытания проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины» методом, указанным в нормативной документации.

Вирусная безопасность

Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg). Препарат не должен содержать поверхностного антигена вируса гепатита В. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих чувствительность не ниже 0,1 МЕ/мл в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу гепатита С. Антитела к вирусу гепатита С должны отсутствовать. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих 100% чувствительность и специфичность в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Препарат не должен содержать антител к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих 100% чувствительность и специфичность в соответствии с инструкциями по применению.

Упаковка и маркировка. В соответствии ОФС «Лекарственные препараты из плазмы крови человека».

Хранение. Хранят в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С, если нет других указаний в нормативной документации.

Федеральная электронная медицинская библиотека

Альбумин человека	**ФС.3.3.2.0006.15** **Взамен ФС 42-122-04**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на препараты альбумина человека, растворы для инфузий 5, 10, 20 и 25%, содержащие основной белок донорской плазмы человека.

ПРОИЗВОДСТВО

Для производства препаратов альбумина используется плазма крови здоровых доноров, соответствующая требованиям ФС «Плазма человека для фракционирования».

Препараты альбумина человека, растворы для инфузий получают модифицированным спиртовым методом фракционирования сывороточных белков при низких температурах. Производство альбумина должно гарантировать сохранение структуры и функции белка альбумина, обеспечивающее специфическую и вирусную безопасность препарата, исключающее контаминацию чужеродными агентами.

Раствор альбумина человека прогревают при температуре 60 °С не менее 10 ч, а затем выдерживают при температуре (30–32)°С в течение 14 сут или при температуре (20-25)°С не менее 4 нед, после чего исследуют визуально для обнаружения признаков микробного загрязнения.

Альбумин содержит стабилизаторы: натрия каприлат, N-ацетилтриптофан или их сочетание.

В процессе производства не используются антимикробные консерванты.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачный или слегка опалесцирующий раствор желтого, янтарного или зеленоватого цвета. Определение проводят визуально.

Подлинность

Видоспецифичность. В препарате должны присутствовать только сывороточные белки крови человека. Испытание проводят методом иммуноэлектрофореза в геле с использованием сывороток против сывороточных белков крови человека, крупного рогатого скота, лошади и свиньи в соответствии с ОФС «Иммуноэлектрофорез в агаровом геле». Допустимо проведение испытания методом иммунодиффузии в геле в соответствии с ОФС «Иммунодиффузия в геле».

Основной белковый компонент. В препаратах должен обнаруживаться основной белковый компонент с подвижностью альбумина человека. Испытание проводят методом электрофореза на ацетате целлюлозы в соответствии с ОФС «Определение однородности лекарственных препаратов из сыворотки крови человека и животных методом электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы».

Гемпигменты. Оптическая плотность испытуемого 1 % водного раствора альбумина при длине волны 403 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм против воды должна быть не более 0,15. Определение проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Термостабильность. Препарат после прогрева в течение 50 ч при температуре (56 ± 1)°С должен оставаться без изменений. Определение проводят визуально.

pH. От 6,5 до 7,2. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Фракционный состав. Содержание альбумина должно быть не менее 97 %, а α- и β-глобулинов – не более 3 %. Определение проводят методом электрофореза на пленках ацетата целлюлозы в соответствии с ОФС «Определение однородности лекарственных препаратов из сыворотки крови человека и животных методом электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы».

Белок.

От 4,5 до 5,5 % для 5 % раствора альбумина.

От 9,0 до 11,0 % для 10 % раствора альбумина.

От 18,0 до 22,0 % для 20 % раствора альбумина.

От 22,5 до 27,5 % для 25 % раствора альбумина.

Определение проводят подходящим методом в соответствии с ОФС «Определение белка».

Полимеры и агрегаты. Содержание полимеров и агрегатов должно быть не более 5,0 %. Определение проводят методом эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография».

Натрия каприлат. Не более 0,23 ммоль/г. Определение проводят методом эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография».

Активатор прекалликреина. Не более 35 МЕ/мл. Определение проводят хромогенным методом.

Алюминий. Не более 200 мкг/л. Определение проводят методом атомно-адсорбционной спектрометрии в соответствии с ОФС «Атомно-эмиссионная спектрометрия».

Натрий-ион. От 90 до 160 ммоль/л. Определение проводят методом пламенной фотометрии в соответствии с ОФС «Атомно-эмиссионная спектрометрия».

Калий-ион. Не более 0,05 ммоль/г. Определение проводят методом пламенной фотометрии в соответствии с ОФС «Атомно-эмиссионная и атомно-адсорбционная спектрометрия».

Пирогенность или бактериальные эндотоксины. Препарат должен быть апирогенным или содержание бактериальных эндотоксинов не должно превышать 0,5 ЕЭ/мл для 5% раствора альбумина, 1,3 ЕЭ для 10 и 20% растворов альбумина и 1,7 ЕЭ для 25% раствора альбумина. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Тест-доза для 5 % раствора альбумина составляет 10 мл препарата на 1 кг массы кролика, для 10, 20 и 25% растворов – 5 мл на 1 кг массы кролика или в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

Стерильность. Препарат должен быть стерильным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Вирусная безопасность

Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg). Препарат не должен содержать поверхностного антигена вируса гепатита В. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих чувствительность не ниже 0,1 МЕ/мл в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу гепатита С. Антитела к вирусу гепатита С должны отсутствовать. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих 100% чувствительность и специфичность в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Препарат не должен содержать антител к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих 100% чувствительность и специфичность в соответствии с инструкциями по применению.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные

препараты из плазмы крови человека».

Хранение. При температуре от 2 до 10°С в защищенном от света месте.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Иммуноглобулин человека нормальный	**ФС.3.3.2.0007.15** **Вводится взамен ФС 42-3198-95**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на препараты иммуноглобулина человека нормального для внутримышечного или подкожного введения.

Иммуноглобулин человека нормальный представляет собой иммунологически активную белковую фракцию, содержащую широкий спектр антител, выделенную из плазмы крови человека, основным активным компонентом которой является иммуноглобулин G (Ig G), обладающий активностью антител различной специфичности в отношении различных антигенов.

Препараты иммуноглобулина человека нормального не содержат консерванты и антибиотики.

ПРОИЗВОДСТВО

Сырьем для производства иммуноглобулина человека является плазма крови, полученная не менее чем от 1000 здоровых доноров, которая протестирована на наличие маркеров инфекций, передающихся с кровью, в индивидуальных донациях и пулах и соответствующая требованиям ФС «Плазма человека для фракционирования».

Иммуноглобулин человека нормальный очищают и концентрируют модифицированным спиртовым методом фракционирования сывороточных белков при низких температурах.

Федеральная электронная медицинская библиотека

Производство иммуноглобулина человека нормального должно осуществляться с соблюдением установленных требований правил организации производства и контроля качества лекарственного препарата, гарантирующих сохранение структуры и функции белков иммуноглобулина, обеспечивающих специфическую и вирусную безопасность препарата и исключающих контаминацию чужеродными агентами. Антибактериальная и противовирусная эффективность препаратов должна быть обеспечена соответствующей степенью концентрации антител в процессе производства (не менее, чем в 6 раз).

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачный или слабо опалесцирующий раствор, бесцветный или со светло-желтой окраской (если в нормативной документации не указаны другие требования); в процессе хранения допускается появление незначительного осадка, исчезающего при легком встряхивании. Определение проводят визуально.

Подлинность. Подлинность подтверждают наличием только сывороточных белков крови человека. Испытание проводят методом иммуноэлектрофореза в геле с использованием сывороток против сывороточных белков крови человека, крупного рогатого скота, лошади и свиньи в соответствии с ОФС «Иммунодиффузия в геле». Допустимо проведение испытания методом иммунодиффузии в геле. Метод определения указывают в нормативной документации. В результате испытания должны выявляться линии преципитации только с сывороткой против сывороточных белков крови человека.

Прозрачность. Прозрачный или слегка опалесцирующий раствор с оптической плотностью не более 0,05 (определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей» и ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» в кюветах с толщиной слоя 3 мм при длине волны 540 нм). Метод определения указывают в нормативной документации.

Федеральная электронная медицинская библиотека ЭЭМБ

Цветность. Бесцветный или светло-желтый раствор (определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей») или раствор с оптической плотностью не более 0,15 (определение проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» в кюветах с толщиной слоя 3 мм при длине волны 400 нм). Метод определения указывают в нормативной документации производителя.

Механические включения. Видимые механические включения должны отсутствовать. Определение проводят в соответствии с ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

Извлекаемый объем. Должен быть не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

pH. От 5,0 до 7,4. Испытуемый образец разводят до 1% концентрации 0,9 % раствором натрия хлорида. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Белок. От 9,5 до 16,0%, в зависимости от лекарственной формы. Определение проводят колориметрическим методом с биуретовым реактивом в соответствии с ОФС «Определение белка».

Электрофоретическая однородность. Фракция иммуноглобулинов должна составлять не менее 95 % от общего белка. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение однородности лекарственных препаратов из сыворотки крови человека и животных методом электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы».

Молекулярные параметры. Содержание мономеров и димеров должно быть не менее 85%, полимеров и агрегатов – не более 10%. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение молекулярных параметров иммуноглобулинов методом ВЭЖХ».

Фракционный состав. Испытуемый образец разводят до 1% концентрации 0,9% раствором натрия хлорида. Должна выявляться

интенсивная линия преципитации IgG и не более четырех дополнительных линий. Определение проводят методом иммуноэлектрофореза в геле с использованием сыворотки против сывороточных белков крови человека в соответствии с ОФС «Иммуноэлектрофорез в агаровом геле».

Термостабильность. Препарат должен оставаться жидким и не образовывать геля после выдерживания в водяной бане или водяном термостате при температуре (56±1)°С в течение 4 ч.

Стабилизаторы. Проводят количественное определение вносимого(ых) в препарат стабилизатора(ов) методом(ами) в соответствии с ОФС «Газовая хроматография» и/или в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)» (если в нормативной документации не указан другой метод). Допустимый предел содержания стабилизаторов должен быть указан в нормативной документации.

Стерильность. Должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность или **Бактериальные эндотоксины.** Должен быть апирогенным или содержать бактериальные эндотоксины в количестве менее 5 ЕЭ/мл.

Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность» (тест-доза должна составлять 1,0 мл препарата на кг массы кролика) или в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины» методом, указанным в нормативной документации.

Аномальная токсичность. Препарат должен быть нетоксичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Испытания проводят на 5 здоровых белых мышах массой тела 18-20 г и двух морских свинках массой тела 250-300 г. Тест-доза для белых мышей составляет 0,5 мл (внутрибрюшинно), для морских свинок – 5,0 мл (подкожно в оба бока по 2,5 мл) (если нет других указаний в нормативной документации). Период наблюдения за животными составляет 7 суток.

ФЭМБ Федеральный электронный медицинский библиотечный

Содержание антител (специфическая активность)**.** Указывают количественное содержание антибактериальных антител (минимум против одного возбудителя) и противовирусных антител (минимум против одного возбудителя). Определение проводят по методикам, указанным в нормативной документации (например, содержание противокоревых антител – в реакции пассивной гемагглютинации, содержание антиальфастафилолизина – в реакции нейтрализации гемолитических свойств стафилококкового альфатоксина) с использованием стандартных образцов.

Анти-А и анти-В гемагглютинины (для лекарственной формы для подкожного введения)**.** Агглютинация должна отсутствовать в разведении препарата 1:64. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение анти-А и анти-В гемагглютининов в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека».

Анти-D антитела. (для лекарственной формы для подкожного введения). Содержание анти-D антител в препарате должно быть не более, чем в положительном стандартном образце. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Испытание на анти-D антитела в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека».

Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg). Препарат не должен содержать поверхностного антигена вируса гепатита В. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения Российской Федерации и имеющих чувствительность не ниже 0,1 МЕ/мл, в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу гепатита С. Антитела к вирусу гепатита С должны отсутствовать. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения Российской Федерации и имеющих 100 % чувствительность и специфичность, в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Препарат не должен содержать антител к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения Российской Федерации и имеющих 100% чувствительность и специфичность, в соответствии с инструкциями по применению.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные препараты из плазмы крови человека».

На вторичную (потребительскую) упаковку лекарственных средств, должна наноситься надпись: «Антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, к вирусу гепатита С и поверхностный антиген вируса гепатита В отсутствуют».

Хранение. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты». Хранят в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8°С, если нет других указаний в нормативной документации. Замораживание не допускается.

Федеральная электронная медицинская библиотека ФЭМБ

Иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения	**ФС.3.3.2.0008.15** **Взамен ФС 42-3159-95**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на препараты иммуноглобулина человека нормального для внутривенного введения.

Иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения представляет собой иммунологически активную белковую фракцию, выделенную из плазмы крови человека, которая содержит широкий спектр антител, основным активным компонентом которой является иммуноглобулин G (Ig G), обладающий активностью в отношении различных антигенов.

Препараты иммуноглобулина человека нормального для внутривенного введения не содержат консерванты и антибиотики.

ПРОИЗВОДСТВО

Сырьем для производства иммуноглобулина человека является плазма крови, полученная не менее чем от 1000 здоровых доноров, которая протестирована на наличие маркеров инфекций, передающихся с кровью, в индивидуальных донациях и пулах и соответствующая требованиям ФС «Плазма человека для фракционирования».

Очистка и концентрирование иммуноглобулина человека нормального для внутривенного введения производится этанольным методом фракционирования по Кону (метод водно-спиртового осаждения на холоде). Метод основан на физико-химических отличиях белков и их различной

растворимости в присутствии этанола при низких температурах, различной ионной силе, диэлектрической постоянной и pH среды с использованием дополнительных методов хроматографической очистки и улучшенной технологии инактивации вирусов, гарантирующих вирусную безопасность лекарственного средства.

Производство иммуноглобулина человека нормального для внутривенного введения должно соответствовать установленным правилам, гарантирующим сохранение структуры и функции белков иммуноглобулина и обеспечивающих вирусную и специфическую безопасность лекарственного средства. Антибактериальная и противовирусная эффективность препаратов иммуноглобулина человека нормального для внутривенного введения должна быть обеспечена соответствующей степенью концентрации антител в процессе производства (не менее, чем в 3 раза при содержании белка в препарате 4,5-5,5% и не менее, чем в 6 раз при содержании белка в препарате 9,0 – 11,0%).

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачный или слабо опалесцирующий раствор, бесцветный или светло-желтой окраски. Лиофилизированный препарат представляет собой аморфную гигроскопичную массу в виде таблетки или порошка белого цвета, допускается светло-желтая окраска (если в нормативной документации не указаны другие требования). Определение проводят визуально.

Подлинность. Подлинность подтверждают наличием только сывороточных белков крови человека. Испытание проводят методом иммуноэлектрофореза в геле с использованием сывороток против сывороточных белков крови человека, крупного рогатого скота, лошади и свиньи в соответствии с ОФС «Иммуноэлектрофорез в агаровом геле» Допустимо проведение испытания методом иммунодиффузии в геле в соответствии с ОФС «Иммунодиффузия в геле». В результате испытания

должны выявляться линии преципитации только с сывороткой против сывороточных белков крови человека.

Время растворения (для лиофилизированных препаратов). Не более 20 мин (если в нормативной документации нет других указаний). Приводят описание методики с указанием применяемого растворителя, его объема и условий растворения (температура растворителя, необходимость перемешивания и др.).

Прозрачность. Прозрачный или слегка опалесцирующий раствор (определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей») или слегка опалесцирующий раствор с оптической плотностью не более 0,05 (определение проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» в кюветах с толщиной слоя 3 мм при длине волны 540 нм). Метод определения указывают в нормативной документации.

Цветность. Должен быть бесцветным или светло- желтой окраски, не превышающей интенсивность окраски эталонного раствора Y5 (определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей») или раствор с оптической плотностью не более 0,05 (определение проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» в кюветах с толщиной слоя 3 мм при длине волны 400 нм). Метод определения указывают в нормативной документации.

Потеря в массе при высушивании (для лиофилизированных препаратов)**.** Не более 3%. На два параллельных анализа отбирают по 0,15-0,20 г испытуемого образца. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

При получении неудовлетворительных результатов контроль повторяют на удвоенном количестве образцов. При получении неудовлетворительных результатов при повторном испытании препарат бракуют.

Механические включения. Видимые механические включения должны отсутствовать. Определение проводят в соответствии с ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

Извлекаемый объем (для жидких препаратов)**.** Должен быть не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

pH. от 4,0 до 7,4. Испытуемый образец разводят до 1% концентрации 0,9% раствором натрия хлорида. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия». В нормативной документации для сухих лекарственных форм указывают название растворителя, описывают методику восстановления лекарственного средства.

Белок. От 4,5 до 5,5% или от 9,5 до 11,0%. Определение проводят колориметрическим методом с биуретовым реактивом в соответствии с ОФС «Определение белка».

Электрофоретическая однородность. Основная фракция иммуноглобулинов IgG должна составлять не менее 95% от общего белка (если в нормативной документации нет других указаний). Испытание проводят в соответствии с ОФС «Определение однородности лекарственных препаратов из сыворотки крови человека и животных методом электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы».

Молекулярные параметры. Содержание мономеров и димеров иммуноглобулина G должно быть не менее 90%, полимеров и агрегатов – не более 3%. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Определение молекулярных параметров иммуноглобулинов методом ВЭЖХ».

Фракционный состав. Испытуемый образец разводят до 1% концентрации 0,9% раствором натрия хлорида. Должна выявляться интенсивная линия преципитации IgG и не более четырех дополнительных линий. Испытание проводят методом иммуноэлектрофореза в геле с

использованием сыворотки против сывороточных белков крови человека в соответствии с ОФС «Иммуноэлектрофорез в агаровом геле».

Термостабильность (для жидких препаратов). Препарат должен оставаться жидким и не образовывать геля после выдерживания в водяной бане или водяном термостате при температуре (56±1)°С в течение 4 ч.

Стабилизаторы. Проводят количественное определение вносимых в препарат стабилизаторов методами, описанными в ОФС «Газовая хроматография» и/или ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», если в нормативной документации нет других указаний.

Допустимый предел содержания стабилизаторов должен быть указан в нормативной документации производителя.

Вирусинактивирующие агенты. Проводят количественное определение остаточного содержания в препарате вирусинактивирующих агентов методами, описанными в ОФС «Газовая хроматография» и/или ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», если в нормативной документации нет других указаний. Допустимый предел содержания вирусинактивирующих агентов должен быть указан в нормативной документации производителя.

Осмоляльность. Значение осмоляльности должно быть не менее 240 мОсм/кг. Определение проводят в соответствии с ОФС «Осмолярность».

Стерильность. Препарат должен быть стерильным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность или **Бактериальные эндотоксины.** Должен быть апирогенным или содержать бактериальные эндотоксины в количестве менее 0,5 ЕЭ/мл (при содержании белка в препарате не более 50 г/л) или менее 1,0 ЕЭ/мл (при содержании белка в препарате более 50 г/л).

Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность» (не менее 0,5 г белка иммуноглобулина на 1 кг массы кролика; объем вводимого препарата не должен превышать 10 мл на 1 кг массы кролика) или в

соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины» методом, указанным в нормативной документации производителя.

Аномальная токсичность. Должен быть нетоксичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Испытания проводят на 5 здоровых белых мышах массой тела 18-20 г и двух морских свинках массой тела 250-300 г. Тест-доза для белых мышей составляет 0,5 мл (внутривенно), для морских свинок – 5,0 мл (подкожно в оба бока по 2,5 мл). Период наблюдения за животными составляет 7 суток.

Содержание антител (специфическая активность). Указывают количественное содержание антибактериальных антител (минимум против одного возбудителя) и противовирусных антител (минимум против одного возбудителя). Определение проводят по методикам, указанным в нормативной документации производителя (например, содержание противокоревых антител – в реакции пассивной гемагглютинации, содержание антиальфастафилолизина – в реакции нейтрализации гемолитических свойств стафилококкового альфатоксина) с использованием стандартных образцов.

Специфическая безопасность

Антикомплементарная активность Допустимый предел связывания комплемента – не более 1 CH_{50}/мг белка, т.е. 1 мг белка иммуноглобулина не должен связывать более 1 CH_{50} комплемента. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение антикомплементарной активности в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека для внутривенного введения».

Анти-А и анти-В гемагглютинины. Агглютинация должна отсутствовать в разведении препарата 1:64. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение анти-А и анти-В гемагглютининов в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека».

Анти-D антитела. Содержание анти-D антител в препарате должно быть не более, чем в положительном стандартном образце. Испытания

проводят в соответствии с ОФС «Испытание на анти-D антитела в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека».

Вирусная безопасность

Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg). Препарат не должен содержать поверхностного антигена вируса гепатита В. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения Российской Федерации и имеющих чувствительность не ниже 0,1 МЕ/мл, в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу гепатита С. Антитела к вирусу гепатита С должны отсутствовать. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения Российской Федерации и имеющих 100% чувствительность и специфичность, в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Препарат не должен содержать антител к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения Российской Федерации и имеющих 100% чувствительность и специфичность, в соответствии с инструкциями по применению.

Упаковка и Маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные препараты из плазмы крови человека».

На вторичную (потребительскую) упаковку лекарственных средств, должна наноситься надпись: «Антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, к вирусу гепатита С и поверхностный антиген вируса гепатита В отсутствуют».

Хранение. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты». Хранят в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8°С, если нет других указаний в нормативной документации. Замораживание не допускается.

П Р И Л О Ж Е Н И Я

Таблица. Наименования, символы и относительные атомные массы элементов

Наименование	Символ	Относительная атомная масса
Азот	N	14,007
Алюминий	Al	26,982
Аргон	Ar	39,948
Барий	Ba	137,33
Бериллий	Be	9,0122
Бор	B	10,811
Бром	Br	79,904
Ванадий	V	50,942
Висмут	Bi	208,98
Водород	H	1,0079
Вольфрам	W	183,84
Гадолиний	Gd	157,25
Галлий	Ga	69,723
Гафний	Hf	178,49
Гелий	He	4,0026
Германий	Ge	72,64
Гольмий	Ho	164,93
Диспрозий	Dy	162,50
Европий	Eu	151,96
Железо	Fe	55,845
Золото	Au	196,97
Индий	In	114,82
Йод	I	126,90
Иридий	Ir	192,22
Иттербий	Yb	173,05
Иттрий	Y	88,906
Кадмий	Cd	112,41
Калий	K	39,098
Кальций	Ca	40,078
Кислород	O	15,999
Кобальт	Co	58,933
Кремний	Si	28,086
Криптон	Kr	83,798
Ксенон	Xe	131,29
Лантан	La	138,91
Литий	Li	6,941

Наименование	Символ	Относительная атомная масса
Неодим	Nd	144,24
Неон	Ne	20,180
Никель	Ni	58,693
Ниобий	Nb	92,906
Олово	Sn	118,71
Осмий	Os	190,23
Палладий	Pd	106,42
Платина	Pt	195,08
Празеодим	Pr	140,91
Прометий	Pm	144,91
Протактиний	Pa	231,04
Рений	Re	186,21
Родий	Rh	102,91
Ртуть	Hg	200,59
Рубидий	Rb	85,468
Рутений	Ru	101,07
Самарий	Sm	150,36
Свинец	Pb	207,2
Селен	Se	78,96
Сера	S	32,066
Серебро	Ag	107,87
Скандий	Sc	44,956
Стронций	Sr	87,62
Сурьма	Sb	121,76
Таллий	Tl	204,38
Тантал	Ta	180,95
Теллур	Te	127,60
Тербий	Tb	158,93
Титан	Ti	47,867
Торий	Th	232,04
Тулий	Tm	168,93
Углерод	C	12,011
Уран	U	238,03
Фосфор	P	30,974
Фтор	F	18,998
Хлор	Cl	35,453

Наименование	Символ	Относительная атомная масса		Наименование	Символ	Относительная атомная масса
Лютеций	Lu	174,97		Хром	Cr	51,996
Магний	Mg	24,305		Цезий	Cs	132,91
Марганец	Mn	54,938		Церий	Ce	140,12
Медь	Cu	63,546		Цинк	Zn	65,38
Молибден	Mo	95,94		Цирконий	Zr	91,224
Мышьяк	As	74,922		Эрбий	Er	167,26
Натрий	Na	22,990				

Примечание. Приведенные относительные атомные массы элементов приняты Международным союзом по теоретической и прикладной химии (IUPAC) в 2007 г. и определены относительно изотопа ^{12}C.

Обозначения относительных атомных масс пятью цифрами, кроме самых тяжелых, рекомендовано IUPAC с 1997 г.

В таблице не приведены относительные атомные массы искусственных радиоактивных элементов.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Таблица. Количество капель в 1 г и в 1 мл и масса 1 капли жидких лекарственных препаратов при температуре 20 °С по стандартному каплемеру

Наименование	Количество капель		Масса 1 капли, мг
	в 1 г	в 1 мл	
Адонизид	35	34	29
Адреналина гидрохлорида раствор 0,1%	25	25	40
Валерианы настойка	56	51	18
Валидол	54	48	19
Вода очищенная, вода для инъекций	20	20	50
Йода спиртовой раствор 10%	63	56	16
Йода спиртовой раствор 5%	49	48	20
Красавки настойка	46	44	22
Крушины экстракт жидкий	39	40	26
Ландыша настойка	56	50	18
Мяты перечной масло	51	47	20
Мяты перечной настойка	61	52	16
Нашатырно-анисовые капли	56	49	18
Никетамид	29	29	34
Нитроглицерина раствор 1%	65	53	15
Полыни настойка	56	51	18
Пустырника настойка	56	51	18
Ретинола ацетата раствор масляный	45	41	22
Хлористоводородная кислота разведённая 8,3%	20	21	50
Хлороформ	59	87	17
Эфир медицинский	87	62	11

ГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России Кафедра медицинской информатики Электронная медицинская библиотека

Примечания.

1. Стандартный каплемер имеет наружный диаметр выпускной трубки 3 мм, внутренний – 0,6 мм и калибруется по дистиллированной воде путём 5-кратного взвешивания 20 капель, масса которых должна быть от 0,95 до 1,05 г.

2. Капли следует отмеривать путём свободного истечения жидкости. Рекомендуется фиксировать каплемер в штативе. Каплемер необходимо очищать хромовой смесью, промывать водой и высушивать, выпускной его конец следует защищать от ударов.

3. При отсутствии стандартного каплемера последний может быть заменён пипеткой, откалиброванной по соответствующей жидкости путём 5-кратного взвешивания 20 капель жидкости.

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Таблица. Изотонические эквиваленты лекарственных веществ по натрия хлориду

Наименование препарата	Эквивалент		Наименование препарата	Эквивалент
Аминофиллин	0,17		Натрия пара-аминосалицилат	0,27
Амобарбитал	0,25		Натрия салицилат	0,35
Апоморфина гидрохлорид	0,14		Натрия сульфат	0,23
Аскорбиновая кислота	0,18		Натрия тетраборат	0,34
Атропина сульфат	0,10		Натрия тиосульфат	0,30
Борная кислота	0,53		Натрия фосфат	0,40
Гоматропина метилбромид	0,16		Натрия хлорид	1,00
Декстроза (безводная)	0,18		Натрия цитрат для инъекций	0,30
Дифенгидрамин	0,20		Никотинамид	0,20
Калия йодид	0,35		Никотиновая кислота	0,25
Калия хлорид	0,76		Папаверина гидрохлорид	0,10
Кальция глюконат	0,16		Пилокарпина гидрохлорид	0,22
Кальция хлорид	0,36		Прокаин	0,18
Кодеина фосфат	0,12		Прокаинамид	0,22
Кокаина гидрохлорид	0,14		Серебра нитрат	0,33
Кофеин-бензоат натрия	0,23		Скополамина гидробромид	0,11
Лобелина гидрохлорид	0,14		Стрихнина нитрат	0,12
Магния сульфат	0,14		Тетракаин	0,18
Меди сульфат	0,13		Тиамина хлорид	0,21
Морфина гидрохлорид	0,15		Тримеперидин	0,22
Натрия бензоат	0,40		Физостигмина салицилат	0,16
Натрия бисульфит	0,60		Хлорпромазин	0,10
Натрия бромид	0,62		Цинка сульфат	0,12
Натрия гидрокарбонат	0,65		Эметина гидрохлорид	0,10
Натрия йодид	0,38		Этилморфина гидрохлорид	0,15
Натрия метабисульфит	0,65		Эфедрина гидрохлорид	0,28
Натрия нитрит	0,83			

Примечание. Изотонический эквивалент по натрия хлориду показывает количество хлорида натрия в граммах, создающее в одинаковых условиях осмотическое давление, равное осмотическому давлению 1 г данного препарата.

Таблица позволяет определить количество натрия хлорида, необходимое для изотонирования раствора.

Пример расчёта:

Тетракаина	3 г
Натрия хлорида	достаточное количество для получения изотонического раствора
Воды для инъекций	до 1 л

Для приготовления изотонического раствора только из натрия хлорида последнего нужно взять 9 г на 1000 мл раствора (изотоническая концентрация натрия хлорида равна 0,9%). Содержащийся в прописи тетракаин (3 г) создаёт определённое осмотическое давление, вследствие чего натрия хлорида нужно взять соответственно меньше. Эквивалент 1 г тетракаина по хлориду натрия равен 0,18. Следовательно, 3 г тетракаина будут создавать осмотическое давление, равное осмотическому давлению 0,54 г натрия хлорида ($3 \cdot 0{,}18 = 0{,}54$). Таким образом, натрия хлорида необходимо взять: 9 г – 0,54 г = 8,46 г.

Федеральная электронная медицинская библиотека ЭЭМБ

Алкоголеметрические таблицы

Таблица 1. Соотношение между плотностью водно-спиртового раствора и содержанием безводного спирта в растворе

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,99823	0,00	0,00	0,00	0,00
80	12	16	13	16
0,9978	23	29	23	29
6	34	43	34	43
4	44	56	44	56
2	55	70	55	70
0	66	83	66	83
0,9968	77	97	77	97
6	87	1,10	87	1,10
4	98	24	98	24
2	1,09	38	1,09	38
0	20	51	19	51
0,9958	31	65	32	66
6	42	79	41	80
4	52	92	52	93
2	63	2,06	63	2,07
0	74	20	74	21
0,9948	85	34	85	35
6	96	48	96	50
4	2,07	62	2,07	64
2	19	76	18	78
0	29	90	29	92
0,9938	41	3,04	40	3,06
6	52	18	51	20
4	63	32	62	34
2	75	46	73	48
0	86	60	84	63
0,9928	97	74	95	77
6	3,09	89	3,07	92
4	20	4,03	18	4,06
2	32	17	29	20
0	44	32	41	36
0,9918	55	46	52	50
6	67	61	64	65
4	78	75	75	80
2	90	90	87	95
0	4,02	5,05	99	5,10

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,9908	4,14	5,20	4,10	5,25
6	26	35	22	41
4	38	50	34	56
2	50	65	46	71
0	62	80	58	87
0,9898	75	95	70	6,02
6	87	6,10	81	17
4	99	26	94	34
2	5,11	41	5,06	49
0	24	57	19	65
0,9888	37	73	31	81
6	49	88	43	97
4	62	7,04	56	7,13
2	75	20	68	29
0	87	36	81	46
0,9878	6,00	52	94	62
6	13	67	6,05	77
4	26	83	18	94
2	39	99	31	8,10
0	52	8,15	43	27
0,9868	65	32	57	44
6	78	48	69	61
4	92	64	82	77
2	7,05	80	95	93
0	18	97	7,08	9,11
0,9858	32	9,13	21	27
6	45	30	34	45
4	58	47	47	62
2	72	63	60	78
0	85	80	73	96
0,9848	99	97	87	10,13
6	8,12	10,13	8,00	30
4	26	30	13	47
2	39	47	26	65
0	53	63	39	82
0,9838	67	80	52	99
6	80	97	66	11,17

Федеральное бюджетное учреждение «Государственный региональный центр стандартизации, метрологии и испытаний в Республике Татарстан»

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,9834	8,94	11,14	8,79	11,34
2	9,08	31	93	52
0	22	48	9,06	70
0,9828	35	65	19	87
6	49	82	33	12,04
4	63	99	46	22
2	77	12,16	60	40
0	91	34	74	58
0,9818	10,05	51	87	75
6	19	68	10,01	93
4	34	85	14	13,11
2	48	13,03	28	29
0	62	20	42	47
0,9808	76	38	56	66
6	91	55	69	83
4	11,05	73	84	14,02
2	20	90	97	20
0	34	14,08	11,11	38
0,9798	49	26	25	57
6	64	44	40	76
4	78	62	54	94
2	93	79	67	15,12
0	12,07	97	82	31
0,9788	22	15,15	96	50
6	37	34	12,11	69
4	52	52	25	88
2	67	70	39	16,07
0	81	88	53	26
0,9778	96	16,06	68	44
6	13,11	25	83	64
4	27	43	97	83
2	42	61	13,11	17,01
0	57	80	26	21
0,9768	72	98	40	40
6	87	17,17	55	60
4	14,02	35	69	79
2	18	54	84	99
0	33	73	99	18,19
0,9758	49	91	14,14	38
6	64	18,10	29	58
4	80	29	44	78
2	96	48	59	97
0	15,11	67	74	19,17

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,9748	15,27	18,86	14,89	19,37
6	43	19,05	15,04	57
4	58	24	19	77
2	74	43	34	97
0	90	62	49	20,16
0,9738	16,05	81	64	36
6	21	20,00	79	56
4	37	19	94	76
2	52	37	16,08	95
0	68	56	23	21,15
0,9728	84	75	38	35
6	99	93	52	54
4	17,15	21,12	67	74
2	30	31	82	94
0	45	49	96	22,13
0,9718	61	68	17,11	33
6	76	86	25	52
4	92	22,05	40	72
2	18,07	23	55	91
0	22	41	69	23,10
0,9708	37	60	84	31
6	52	78	98	50
4	67	96	18,12	69
2	83	23,14	26	88
0	98	32	41	24,07
0,9698	19,13	50	55	26
6	28	68	69	45
4	43	86	83	64
2	58	24,04	97	83
0	73	22	19,12	25,02
0,9688	88	40	26	21
6	20,03	57	39	40
4	18	75	53	59
2	33	93	68	77
0	47	25,11	82	96
0,9678	62	28	95	26,15
6	77	46	20,09	34
4	92	64	24	53
2	21,07	81	37	72
0	21	99	51	91
0,9668	36	26,16	65	27,09
6	50	34	79	28
4	65	51	92	47

Федеральный электронный медицинский библиотека ФЭМБ

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,9662	21,80	26,68	21,06	27,65
0	94	85	19	83
0,9658	22,09	27,03	33	28,02
6	23	20	47	20
4	37	37	60	38
2	52	54	74	56
0	66	71	87	75
0,9648	81	88	22,00	93
6	95	28,05	14	29,12
4	23,09	22	27	29
2	23	38	40	47
0	38	55	53	65
0,9638	52	72	67	83
6	66	88	79	30,00
4	80	29,05	93	18
2	94	21	23,05	36
0	24,08	38	19	54
0,9628	22	54	32	71
6	36	71	45	90
4	50	87	58	31,07
2	64	30,03	70	24
0	78	19	83	42
0,9618	92	35	95	60
6	25,05	52	24,09	78
4	19	68	21	95
2	32	84	34	32,12
0	46	31,00	47	30
0,9608	59	16	59	48
6	73	31	71	63
4	86	47	84	81
2	26,00	63	96	98
0	13	78	25,08	33,14
0,9598	26	94	21	31
6	39	32,09	33	48
4	52	24	45	64
2	65	39	56	81
0	78	54	68	96
0,9588	92	69	80	34,13
6	27,04	84	92	29
4	17	99	26,04	46
2	30	33,14	16	62

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,9580	27,43	33,29	26,27	34,79
0,9578	55	44	39	95
6	68	59	51	35,11
4	81	73	62	26
2	94	88	74	43
0	28,06	34,03	86	59
0,9568	19	17	97	75
6	31	31	27,08	90
4	43	45	19	36,06
2	56	60	31	22
0	68	74	42	37
0,9558	80	88	53	53
6	93	35,02	64	68
4	29,05	16	75	84
2	17	30	86	99
0	29	44	97	37,15
0,9548	41	58	28,07	30
6	53	72	19	46
4	65	85	30	51
2	77	99	41	76
0	89	36,13	52	92
0,9538	30,01	26	62	38,06
6	13	40	73	21
4	25	53	83	36
2	36	67	94	51
0	48	80	29,05	66
0,9528	60	94	16	81
6	72	37,07	26	96
4	84	20	36	39,10
2	95	34	47	25
0	31,07	47	57	40
0,9518	18	60	68	55
6	30	73	78	69
4	41	86	88	84
2	53	99	98	98
0	64	38,12	30,09	40,12
0,9508	76	25	19	27
6	87	38	29	42
4	99	51	39	56
2	32,10	64	50	70
0	21	77	60	85

Федеральный ЭМБ
медицинская электронная библиотека

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,9498	32,33	38,90	30,70	41,00
6	44	39,03	81	14
4	55	15	90	28
2	66	28	31,00	42
0	78	40	10	56
0,9488	89	53	20	71
6	33,00	66	30	86
4	11	78	40	99
2	22	91	50	42,14
0	33	40,04	60	28
0,9478	44	16	70	42
6	55	28	79	56
4	66	41	89	70
2	77	53	99	84
0	88	65	32,08	98
0,9468	99	78	18	43,12
6	34,10	90	28	26
4	21	41,02	38	39
2	32	15	48	54
0	43	27	57	68
0,9458	54	39	67	81
6	65	51	76	95
4	76	63	86	44,08
2	86	75	95	22
0	97	87	33,05	35
0,9448	35,08	99	14	49
6	19	42,11	24	63
4	29	23	33	76
2	40	35	43	90
0	50	46	51	45,03
0,9438	61	58	61	17
6	71	70	70	30
4	82	82	80	44
2	93	94	89	58
0	36,03	43,05	98	71
0,9428	13	17	34,07	84
6	24	28	16	97
4	34	39	25	46,10
2	45	51	34	23
0	55	62	43	36
0,9418	65	74	52	49
6	76	85	61	62
4	86	97	70	75

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,9412	36,96	44,08	34,79	46,88
0	37,07	19	88	47,01
0,9408	17	30	96	14
6	27	42	35,06	27
4	37	53	15	41
2	47	64	23	53
0	58	75	32	66
0,9398	68	86	41	79
6	78	98	50	93
4	88	45,09	59	48,06
2	98	20	68	18
0	38,09	31	76	31
0,9388	19	42	85	43
6	29	53	94	56
4	39	64	36,02	69
2	49	75	11	82
0	59	86	20	95
0,9378	69	97	28	49,07
6	79	46,08	37	20
4	89	19	46	33
2	99	30	54	46
0	39,09	41	63	58
0,9368	19	52	72	71
6	29	63	80	84
4	39	73	88	96
2	49	84	97	50,08
0	59	95	37,06	21
0,9358	69	47,06	14	34
6	79	17	23	47
4	89	27	31	59
2	99	38	40	72
0	40,09	49	48	85
0,9348	19	59	56	97
6	29	70	65	51,10
4	38	81	73	22
2	48	92	82	35
0	58	48,02	90	47
0,9338	68	13	99	60
6	78	23	38,07	72
4	88	33	15	84
2	98	44	23	97
0	41,07	54	31	52,09
0,9328	17	65	40	22

Федеральный ЭМВ
медицинская библиотека

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,9326	41,27	48,75	38,48	52,34
4	36	86	56	46
2	46	96	64	58
0	56	49,07	73	71
0,9318	65	17	81	83
6	75	27	89	95
4	85	38	97	53,08
2	94	48	39,05	20
0	42,04	58	13	32
0,9308	13	69	22	45
6	23	79	30	56
4	33	89	38	68
2	42	99	46	80
0	52	50,10	54	93
0,9298	61	20	62	54,05
6	71	30	70	17
4	80	40	78	29
2	90	50	86	41
0	43,00	60	94	53
0,9288	09	71	40,02	66
6	18	81	10	78
4	28	91	18	90
2	37	51,01	26	55,02
0	47	11	34	14
0,9278	56	21	42	26
6	66	31	50	38
4	75	41	58	50
2	85	51	66	62
0	94	61	73	74
0,9268	44,04	71	81	86
6	13	81	89	98
4	23	91	97	56,10
2	32	52,00	41,04	21
0	41	10	12	33
0,9258	51	20	20	45
6	60	30	28	57
4	70	40	36	69
2	79	50	44	81
0	88	60	52	93
0,9248	98	69	59	57,04
6	45,07	79	67	16
4	16	89	74	28
2	26	99	82	40

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,9240	45,35	53,09	41,90	57,52
0,9238	44	18	97	63
6	53	28	42,05	75
4	63	38	13	88
2	72	48	21	58,00
0	81	57	28	11
0,9228	91	67	36	23
6	46,00	77	44	35
4	09	86	51	46
2	18	96	59	58
0	28	54,06	67	70
0,9218	37	15	74	81
6	46	25	82	93
4	55	34	89	59,05
2	65	44	97	17
0	74	54	43,05	29
0,9208	83	63	12	40
6	92	73	20	52
4	47,01	82	27	63
2	10	92	35	75
0	20	55,01	42	86
0,9198	29	11	50	98
6	38	20	57	60,10
4	47	30	65	22
2	56	39	72	33
0	65	48	79	44
0,9188	74	58	87	56
6	83	67	94	67
4	93	77	44,02	79
2	48,02	86	09	91
0	11	95	16	61,02
0,9178	20	56,05	24	14
6	29	14	31	25
4	38	23	38	37
2	47	33	46	49
0	56	42	53	60
0,9168	65	51	60	71
6	75	61	68	83
4	84	70	75	95
2	93	79	82	62,06
0	49,02	89	90	18
0,9158	11	98	97	29
6	20	57,07	45,04	40

Федеральный ЭМБ
Медицинская электронная библиотека

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,9154	49,29	57,17	45,12	62,53
2	38	26	19	64
0	47	35	26	76
0,9148	56	44	34	87
6	65	53	41	98
4	74	62	48	63,09
2	83	72	56	21
0	92	81	63	32
0,9138	50,01	90	70	44
6	10	99	77	55
4	19	58,08	84	66
2	28	17	91	77
0	37	26	98	89
0,9128	46	35	46,05	64,00
6	55	44	12	11
4	64	54	20	23
2	73	63	27	35
0	82	72	35	46
0,9118	91	81	42	57
6	51,00	90	49	68
4	09	99	56	80
2	18	59,08	63	91
0	27	17	70	65,02
0,9108	36	26	77	14
6	45	35	84	25
4	54	44	91	36
2	63	53	99	48
0	71	62	47,06	59
0,9098	80	71	13	70
6	89	80	20	82
4	98	89	27	93
2	52,07	98	34	66,05
0	16	60,07	41	16
0,9088	25	16	48	27
6	34	25	55	39
4	43	34	62	50
2	52	43	70	61
0	60	52	77	72
0,9078	69	60	83	83
6	78	69	90	95
4	87	78	97	67,06
2	96	87	48,04	17
0	53,05	96	11	29

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,9068	53,14	61,05	48,18	67,41
6	22	14	26	52
4	31	22	32	62
2	40	31	39	73
0	49	40	46	85
0,9058	58	49	53	97
6	67	57	60	68,07
4	75	66	67	19
2	84	75	74	30
0	93	84	81	41
0,9048	54,02	92	87	52
6	11	62,01	94	63
4	19	10	49,01	75
2	28	19	08	87
0	37	27	15	96
0,9038	46	36	22	69,08
6	54	45	29	19
4	63	53	35	30
2	72	62	42	42
0	81	71	50	53
0,9028	89	79	56	63
6	98	88	63	74
4	55,07	97	70	86
2	16	63,05	76	97
0	25	14	83	70,08
0,9018	33	22	90	19
6	42	31	97	30
4	51	40	50,04	42
2	60	48	10	52
0	68	57	17	64
0,9008	77	65	24	75
6	86	74	31	86
4	95	82	37	97
2	56,03	91	44	71,08
0	12	64,00	51	20
0,8998	21	08	58	30
6	30	17	65	42
4	38	25	71	53
2	47	34	78	64
0	56	42	84	75
0,8988	65	51	92	86
6	73	59	99	97
4	82	68	51,05	72,08

Федеральный ЭМБ
медицинской библиотеки

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,8982	56,91	64,76	51,11	72,19
0	57,00	85	18	30
0,8978	08	93	25	41
6	17	65,02	32	53
4	26	10	38	63
2	34	18	44	73
0	43	27	52	85
0,8968	52	35	58	96
6	60	43	64	73,06
4	69	52	71	18
2	78	61	78	30
0	87	69	85	41
0,8958	95	77	91	51
6	58,04	86	99	63
4	13	94	52,05	73
2	21	66,02	11	84
0	30	11	18	95
0,8948	39	19	24	74,06
6	47	27	30	17
4	56	36	38	29
2	65	44	44	39
0	74	53	51	51
0,8938	82	61	57	61
6	91	69	64	72
4	59,00	77	70	83
2	08	86	77	95
0	17	94	83	75,05
0,8928	26	67,02	90	16
6	34	11	97	27
4	43	19	53,03	39
2	52	27	09	49
0	60	36	17	61
0,8918	69	44	23	72
6	77	52	29	83
4	86	61	36	94
2	95	69	43	76,05
0	60,03	77	49	15
0,8908	12	85	55	26
6	21	94	62	38
4	29	68,02	69	49
2	38	10	75	59
0	47	18	81	70
0,8898	55	26	88	81

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,8986	60,64	68,35	53,95	76,93
4	72	43	54,01	77,04
2	81	51	07	14
0	90	59	14	25
0,8888	98	67	20	36
6	61,07	75	26	47
4	15	83	33	57
2	24	91	39	68
0	33	69,00	46	80
0,8878	41	08	52	91
6	50	16	59	78,02
4	58	24	65	12
2	67	32	71	23
0	76	40	78	34
0,8868	84	48	84	45
6	93	56	90	56
4	62,01	64	96	66
2	10	72	55,03	77
0	18	80	09	88
0,8858	27	88	15	99
6	36	96	22	79,10
4	44	70,05	29	21
2	53	12	34	31
0	61	20	41	42
0,8848	70	28	47	53
6	79	36	53	64
4	87	45	60	75
2	96	53	67	86
0	63,04	61	73	97
0,8838	13	69	79	80,08
6	21	77	86	19
4	30	85	92	30
2	39	93	98	40
0	47	71,01	56,05	51
0,8828	56	09	11	62
6	64	17	17	73
4	73	25	24	84
2	82	33	30	95
0	90	41	36	81,06
0,8818	99	49	42	17
6	64,07	57	49	28
4	16	65	55	39
2	24	72	61	49

Федеральный ЭМБ
медицинская библиотека

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,8810	64,33	71,80	56,67	81,60
0,8808	41	88	73	70
6	50	96	80	81
4	59	72,04	86	93
2	67	12	92	82,04
0	76	20	99	15
0,8798	84	28	57,05	25
6	93	36	11	36
4	65,01	44	17	47
2	10	51	23	57
0	18	59	29	68
0,8788	27	67	36	79
6	35	75	42	90
4	44	83	48	83,01
2	52	91	55	12
0	61	98	60	22
0,8778	69	73,06	66	33
6	78	14	73	45
4	86	22	79	56
2	95	29	85	66
0	66,03	37	91	77
0,8768	12	45	97	87
6	20	53	58,03	98
4	29	60	09	84,08
2	37	68	15	19
0	46	76	22	30
0,8758	54	84	28	42
6	63	91	33	51
4	71	99	40	63
2	80	74,07	46	74
0	88	15	52	85
0,8748	97	22	58	95
6	67,05	30	64	85,06
4	14	37	70	16
2	22	45	76	27
0	31	53	82	38
0,8738	39	61	89	49
6	47	68	94	59
4	56	76	59,01	70
2	64	84	07	81
0	73	91	12	91
0,8728	81	99	19	86,03
6	90	75,06	24	12

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,8724	67,98	75,14	59,31	86,24
2	68,07	22	37	35
0	15	29	42	45
0,8718	24	37	49	56
6	32	45	55	67
4	41	52	61	77
2	49	60	67	89
0	58	68	73	87,00
0,8708	66	75	79	10
6	75	83	85	21
4	83	90	91	31
2	92	98	97	42
0	69,00	76,06	60,03	53
0,8698	08	13	09	63
6	17	21	15	74
4	25	28	21	85
2	34	36	27	96
0	42	43	32	88,06
0,8688	51	51	39	17
6	59	58	44	27
4	68	66	51	38
2	76	74	57	50
0	84	81	62	60
0,8678	93	89	69	71
6	70,01	96	74	81
4	10	77,04	81	93
2	18	11	86	89,02
0	26	19	92	14
0,8668	35	26	98	24
6	43	33	61,03	34
4	52	41	10	46
2	60	48	15	56
0	68	56	22	67
0,8658	77	63	27	77
6	85	70	33	88
4	94	78	39	99
2	71,02	85	44	90,09
0	10	93	51	21
0,8648	19	78,00	56	31
6	27	07	62	41
4	36	15	68	53
2	44	22	74	63
0	52	29	79	73

Федеральный Электронный Медицинский Библиотека

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,8638	71,61	78,37	61,86	90,84
6	69	44	91	95
4	77	51	97	91,05
2	86	59	62,03	16
0	94	66	08	26
0,8628	72,03	73	14	36
6	11	81	20	47
4	19	88	26	57
2	28	95	31	68
0	37	79,03	38	79
0,8618	44	10	43	90
6	53	17	49	92,00
4	61	24	54	10
2	69	32	60	22
0	78	39	66	32
0,8608	86	46	72	42
6	95	53	77	52
4	73,03	61	83	64
2	11	68	89	74
0	20	75	94	84
0,8598	28	83	63,01	96
6	36	90	06	93,06
4	45	97	12	16
2	53	80,04	17	27
0	61	11	23	37
0,8588	70	19	29	49
6	78	26	35	59
4	86	33	40	70
2	95	40	46	80
0	74,03	47	51	90
0,8578	11	54	57	94,01
6	20	62	63	13
4	28	69	69	23
2	36	76	74	33
0	44	83	80	43
0,8568	53	90	85	54
6	61	97	91	64
4	69	81,05	97	76
2	78	12	64,03	87
0	86	19	08	97
0,8558	94	26	14	95,07
6	75,02	33	19	17
4	11	40	25	28

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,8552	75,19	81,47	64,30	95,38
0	27	54	36	49
0,8548	35	61	41	59
6	44	68	47	70
4	52	75	52	80
2	60	82	58	90
0	69	89	63	96,01
0,8538	77	96	68	11
6	85	82,03	74	21
4	93	10	80	32
2	76,01	17	85	43
0	10	24	91	53
0,8528	18	31	96	63
6	26	38	65,02	74
4	35	45	08	85
2	43	52	13	95
0	51	59	19	97,06
0,8518	59	66	24	16
6	67	73	30	27
4	76	80	35	38
2	84	87	41	48
0	92	94	46	59
0,8508	77,00	83,01	52	69
6	09	08	57	80
4	17	14	62	89
2	25	21	68	99
0	33	28	73	98,10
0,8498	42	35	79	20
6	50	42	84	31
4	58	49	90	42
2	66	56	95	53
0	74	63	66,01	63
0,8488	83	69	05	73
6	91	76	11	83
4	99	83	16	93
2	78,07	90	22	99,04
0	16	97	28	15
0,8478	24	84,04	33	25
6	32	10	38	34
4	40	17	43	45
2	48	24	49	56
0	56	31	54	67
0,8468	64	38	60	78

Федеральный ЭМВ
Медицинская электронная библиотека

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе				Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе		В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему				По массе	По объему		
0,8466	78,73	84,44	66,65	99,87	0,8380	82,20	87,28	68,89	104,29
4	81	51	70	98	0,8378	28	34	93	38
2	89	58	76	100,08	6	36	41	99	49
0	97	65	81	19	4	44	47	69,04	59
0,8458	79,05	71	86	28	2	52	53	08	68
6	13	78	91	39	0	60	60	14	79
4	22	85	97	50	0,8368	68	66	19	89
2	30	91	67,02	60	6	76	72	23	98
0	38	98	07	70	4	84	79	29	105,09
0,8448	46	85,05	13	80	2	92	85	34	19
6	54	12	18	91	0	83,00	92	39	30
4	62	18	23	101,01	0,8358	08	98	44	40
2	70	25	29	12	6	16	88,04	49	49
0	78	32	34	23	4	24	11	54	61
0,8438	87	38	39	32	2	32	17	59	70
6	95	45	44	42	0	40	23	64	80
4	80,03	51	49	52	0,8348	48	29	68	89
2	11	58	55	63	6	56	36	74	106,01
0	19	65	60	74	4	64	42	79	10
0,8428	27	71	65	83	2	72	48	83	20
6	35	78	70	94	0	80	54	88	30
4	43	85	76	102,04	0,8338	88	61	94	42
2	51	91	81	14	6	96	67	98	51
0	60	98	86	25	4	84,04	73	70,03	61
0,8418	68	86,05	92	36	2	11	79	08	70
6	76	11	96	45	0	19	86	13	82
4	84	18	68,02	56	0,8328	27	92	18	91
2	92	24	07	65	6	35	98	23	107,01
0	81,00	31	12	76	4	43	89,04	28	10
0,8408	08	37	17	85	2	51	10	32	20
6	16	44	22	96	0	59	16	37	30
4	24	50	27	103,06	0,8318	67	23	43	42
2	32	57	33	17	6	74	29	47	52
0	40	63	37	26	4	82	35	52	61
0,8398	48	70	43	37	2	90	41	57	71
6	56	76	48	47	0	98	47	62	80
4	64	83	53	58	0,8308	85,06	53	66	91
2	72	89	58	67	6	14	59	71	108,00
0	80	96	63	78	4	21	65	76	10
0,8388	88	87,02	68	87	2	29	71	81	20
6	96	09	74	98	0	37	77	85	29
4	82,04	15	78	104,08	0,8298	45	83	90	39
2	12	21	83	18	6	53	90	96	51

Федеральный Экспертный Медицинский Библиотека

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,8294	85,61	89,96	71,00	108,61
2	68	90,02	05	70
0	76	08	10	81
0,8288	84	14	14	90
6	92	20	19	109,00
4	86,00	26	24	10
2	07	32	29	20
0	15	38	33	30
0,8278	23	43	37	38
6	31	49	42	48
4	38	55	47	58
2	46	61	52	68
0	54	67	56	78
0,8268	62	73	61	88
6	69	79	66	98
4	77	85	71	110,08
2	85	91	75	18
0	93	97	80	28
0,8258	87,00	91,03	85	38
6	08	09	89	48
4	16	15	94	58
2	24	20	98	66
0	31	26	72,03	76
0,8248	39	32	08	86
6	47	38	12	96
4	54	44	18	111,06
2	62	50	23	16
0	70	55	27	25
0,8238	78	61	32	35
6	85	67	36	45
4	93	73	41	55
2	88,01	79	45	65
0	08	85	50	75
0,8228	16	90	53	83
6	24	96	58	93
4	31	92,02	63	112,03
2	39	08	68	14
0	47	13	72	22
0,8218	54	19	76	32
6	62	25	81	42
4	69	30	85	51
2	77	36	90	61
0	85	42	94	71

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,8208	88,92	92,47	72,98	112,81
6	89,00	53	73,03	91
4	08	58	07	113,00
2	15	64	12	10
0	23	70	17	20
0,8198	30	75	20	29
6	38	81	25	39
4	45	87	30	49
2	53	92	34	58
0	60	98	39	68
0,8188	68	93,04	43	78
6	75	09	47	86
4	83	14	51	95
2	91	20	56	114,06
0	98	25	60	15
0,8178	90,06	31	65	25
6	13	36	69	33
4	21	42	73	44
2	28	47	77	53
0	35	53	82	63
0,8168	43	58	86	72
6	50	63	90	80
4	58	69	95	91
2	65	74	99	115,00
0	73	80	74,03	10
0,8158	80	85	07	19
6	88	91	12	30
4	95	96	16	38
2	91,03	94,02	21	49
0	10	07	25	58
0,8148	17	12	29	67
6	25	17	33	76
4	32	23	37	86
2	39	28	41	95
0	47	33	45	116,03
0,8138	54	38	49	12
6	61	43	53	21
4	69	49	58	32
2	76	54	62	41
0	83	59	66	50
0,8128	91	64	70	59
6	98	70	74	70
4	92,05	75	78	78

Федеральный ЭМБ
медицинская библиотека

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,8122	92,13	94,80	74,82	116,87
0	20	85	86	96
0,8118	27	91	91	117,07
6	35	96	95	16
4	42	95,01	99	25
2	49	06	75,03	34
0	56	11	07	43
0,8108	64	16	11	52
6	71	21	15	61
4	78	26	19	70
2	85	31	22	80
0	93	36	26	89
0,8098	93,00	41	30	98
6	07	46	34	118,07
4	14	52	39	18
2	22	57	43	27
0	29	62	47	36
0,8088	36	67	51	45
6	43	72	55	54
4	50	77	59	63
2	58	82	63	73
0	65	87	67	82
0,8078	72	92	71	91
6	79	97	75	119,00
4	86	96,02	79	09
2	94	07	83	18
0	94,01	12	86	27
0,8068	08	16	90	35
6	15	21	94	44
4	22	26	98	53
2	29	31	76,02	63
0	36	36	05	72
0,8058	43	41	09	81
6	50	45	13	89
4	57	50	16	98
2	65	55	20	120,08
0	72	60	24	17
0,8048	79	65	28	26
6	86	70	32	35
4	93	74	35	43
2	95,00	79	39	52
0	07	84	43	61
0,8038	14	89	47	70

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему		
0,8036	95,21	96,94	76,51	120,80
4	28	99	55	89
2	35	97,03	58	97
0	42	08	62	121,06
0,8028	49	12	65	14
6	56	17	69	23
4	63	22	74	33
2	70	26	77	40
0	77	31	81	50
0,8018	84	35	85	58
6	91	40	88	67
4	98	44	92	75
2	96,04	49	96	84
0	11	54	77,00	94
0,8008	18	58	03	122,01
6	25	63	07	11
4	32	67	10	19
2	39	72	14	29
0	46	76	17	36
0,7998	52	81	21	46
6	59	86	25	55
4	66	90	28	63
2	73	95	32	72
0	80	99	35	80
0,7988	87	98,04	38	90
6	93	08	41	98
4	97,00	12	44	123,06
2	07	17	48	16
0	14	21	53	24
0,7978	20	25	56	32
6	27	29	59	40
4	34	34	63	50
2	41	38	66	58
0	47	42	69	66
0,7968	54	47	73	76
6	61	51	76	84
4	67	55	79	92
2	74	59	83	99
0	81	64	86	124,09
0,7958	88	68	90	17
6	94	72	93	25
4	98,01	77	97	35
2	08	81	78,00	43

Федеральный ЭМБ
медицинская библиотека

Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе				Плотность ρ_{20}	Содержание безводного спирта в водно-спиртовом растворе			
	В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе		В процентах		Граммов в 100 мл при 20 °С	Миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	По массе	По объему				По массе	По объему		
0,7950	98,14	98,85	78,03	124,51	0,7918	99,19	99,50	78,53	125,84
0,7948	21	89	06	59	6	26	54	56	92
6	27	94	09	69	4	32	58	60	126,01
4	34	98	12	77	2	38	62	63	09
2	41	99,02	15	85	0	45	66	66	17
0	47	06	19	93	0,7908	51	70	69	25
0,7938	54	10	22	125,02	6	58	74	72	33
6	60	14	25	10	4	64	78	75	42
4	67	18	28	18	2	70	82	78	50
2	74	22	31	26	0	77	86	82	58
0	80	26	34	34	0,7898	83	89	84	64
0,7928	87	30	37	43	6	89	93	87	72
6	93	34	41	51	4	96	97	90	81
4	99,00	38	44	59	0,78927	100,00	100,00	78,93	126,87
2	06	42	47	67					
0	13	46	50	75					

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Таблица 2. Массовые количества (в граммах при темпера необходимо смешать, чтобы получить 1 кг спирта крепостью

Крепость взятого спирта, %	30%		40%		50%		60%	
	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вод
96	262	738	355	645	452	548	555	445
95	266	734	360	640	459	541	564	436
94	270	730	366	634	466	534	572	428
93	275	725	371	629	473	527	681	419
92	279	721	377	623	481	519	590	410
91	283	717	383	617	488	512	599	401
90	287	713	389	611	495	505	608	392
89	292	708	395	605	503	497	617	383
88	296	704	401	599	511	489	627	373
87	301	699	407	593	518	482	636	364
86	305	695	413	587	526	474	646	354
85	310	690	419	581	534	466	656	344
84	315	685	426	574	543	457	666	334
83	320	680	432	568	551	449	676	324
82	325	675	439	561	560	440	687	313
81	330	670	446	554	568	432	698	302
80	335	665	453	547	577	423	709	291
79	340	660	460	540	587	413	720	280
78	346	654	468	532	596	404	732	268
77	351	649	475	525	605	395	743	257
76	357	643	483	517	615	385	755	245
75	363	637	491	509	625	375	768	232
74	369	631	499	501	636	364	781	219
73	375	625	507	493	646	354	794	206
72	381	619	516	484	657	343	807	193
71	388	612	525	475	669	331	821	179
70	394	606	534	466	680	320	835	165
69	401	599	543	457	692	308	849	151
68	408	592	553	447	704	296	864	136

атуре 20 °С) воды и спирта различной крепости, которые

от 30 до 92%

	70%		80%		90%		92%	
а	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода
	665	335	783	217	913	87	941	59
	675	325	795	205	927	73	955	45
	686	314	807	193	941	59	970	30
	696	304	820	180	956	44	985	15
	707	293	832	168	970	30		
	717	283	845	155	985	15		
	728	272	858	142				
	739	261	871	129				
	751	249	884	116				
	762	238	898	102				
	774	226	911	89				
	786	214	925	75				
	798	202	940	60				
	810	190	954	46				
	823	177	969	31				
	836	164	984	16				
	849	151						
	863	137						
	876	124						
	890	110						
	905	95						
	920	80						
	935	65						
	951	49						
	967	33						
	983	17						

Крепость взятого спирта, %	30%		40%		50%		60%	
	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вод
67	416	584	562	438	716	284	879	121
66	423	577	572	428	729	271	895	105
65	431	569	583	417	742	258	911	89
64	438	562	593	407	756	244	928	72
63	447	553	604	396	770	230	945	55
62	455	545	616	384	784	216	963	37
61	464	536	627	373	799	201	981	19
60	472	528	639	361	815	185		
59	482	518	652	348	830	170		
58	491	509	665	335	847	153		
57	501	499	678	322	864	136		
56	511	489	692	308	881	119		
55	522	478	706	294	899	101		
54	532	468	720	280	918	82		
53	544	456	736	264	937	63		
52	555	445	751	249	958	42		
51	567	433	768	232	978	22		
50	580	420	785	215				
49	593	407	803	197				
48	607	393	821	179				
47	621	379	840	160				
46	636	364	860	140				
45	651	349	881	119				
44	667	333	902	98				
43	684	316	925	75				
42	701	299	949	51				
41	720	280	974	26				
40	739	261						
39	759	241						
38	781	219						
37	803	197						
36	826	174						
35	851	149						

	70%		80%		90%		92%	
а	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода

Крепость взятого спирта, %	30%		40%		50%		60%	
	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вод
34	878	122						
33	905	95						
32	935	65						

Федеральная ФЭМ
медицинс

	70%		80%		90%		92%	
а	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода

Электронная библиотека

Таблица 3. Объёмные количества воды, добавляемые к 1 л крепости спирта от 30 до 90% (о/о)

Концентрация разводимого спирта (о/о, %)	Приливаемый объём воды для п					
	30%	35%	40%	45%	50%	55%
35	167					
40	335	144				
45	505	290	127			
50	674	436	255	114		
55	845	583	384	229	103	
60	1017	730	514	344	207	95
65	1189	878	644	460	311	190
70	1360	1027	774	577	417	285
75	1535	1177	906	694	523	382
80	1709	1327	1039	812	630	480
85	1884	1478	1172	932	738	578
90	2061	1630	1306	1052	847	677
95	2239	1785	1443	1174	957	779

Примечание. Цифра в месте пересечения горизонтальной 20 °С в мл, который следует прилить к 1000 мл спирта указанной для получения концентрации спирта, указанной в верхней строк объёмов последнего следует смешать с 630 объёмами воды.

Федеральный ОМ медицинс

л спирта известной концентрации для получения заданной

олучения желаемой концентрации (о/о) спирта							
°	60%	65%	70%	75%	80%	85%	90%
	88						
	175	81					
	264	163	76				
	353	246	153	72			
	443	329	231	144	68		
	535	414	310	218	138	65	
	629	501	391	295	209	133	64

и вертикальной строк указывает объём воды при температуре
в левом столбце объёмной концентрации при температуре 20 °С,
е. Пример: для получения 50% спирта из имеющегося 80 % 1000

Электронная библиотека

Таблица 4. Объёмные количества спирта крепостью от 35 смешать для получения 1 л спирта крепостью от 30 до 90 %

Спирт исходный, %	30%		35%		40%		45%		50%		55%	
	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода
95	316	707	368	658	421	607	474	556	526	504	579	451
90	333	687	389	634	444	581	500	526	556	470	611	414
85	353	665	412	609	471	551	529	493	588	434	647	374
80	375	641	438	581	500	519	562	457	625	394	688	330
75	400	614	467	549	533	483	600	417	667	349	733	280
70	429	584	500	514	571	443	643	371	714	298	786	225
65	462	549	538	473	615	396	692	319	769	240	846	161
60	500	509	583	426	667	343	750	258	833	173	916	87
55	545	462	636	371	727	279	818	187	909	94		
50	600	405	700	305	800	204	900	103				
45	667	336	778	225	889	113						
40	750	252	875	126								
35	857	143										

Федеральная медицинская

до 95% (в мл при температуре 20 °С), которые необходимо

60%		65%		70%		75%		80%		85%		90%	
спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода
632	397	684	343	737	288	789	233	842	176	895	119	947	61
667	357	722	299	778	240	833	182	889	122	944	62		
706	313	765	252	824	190	882	127	941	64				
750	265	812	200	875	134	938	67						
800	211	867	141	933	71								
857	150	929											
923	81												

Электронная библиотека

Таблица 5. Объёмные количества спирта крепостью от 95, необходимо смешать для получения 1 л спирта крепостью от

Спирт исходный % (о/о)	30%		35%		40%		
	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт
96,5	310,9	713,1	362,7	664,7	414,5	615,3	466,3
96,4	311,2	712,7	363,1	664,2	414,9	614,8	466,8
96,3	311,5	712,3	363,4	663,8	415,4	614,3	467,3
96,2	311,9	712,0	363,8	663,3	415,8	613,7	467,8
96,1	312,2	711,6	364,2	662,9	416,2	613,2	468,2
96,0	312,5	711,2	364,6	662,4	416,7	612,7	468,8
95,9	312,8	710,8	365,0	662,0	417,1	612,2	469,2
95,8	313,2	710,4	365,3	661,5	417,5	611,7	469,7
95,7	313,5	710,0	365,7	661,1	418,0	611,1	470,2
95,6	313,8	709,6	366,1	660,6	418,4	610,6	470,7
95,5	314,1	709,2	366,5	660,1	418,8	610,1	471,2
95,4	314,5	708,8	366,9	659,7	419,3	609,6	471,7
95,3	314,8	708,4	367,3	659,2	419,7	609,1	472,2
95,2	315,1	708,0	367,6	658,8	420,2	608,5	472,7
95,1	315,5	707,6	368,0	658,3	420,6	608,0	473,2

Спирт исходный % (о/о)	65%		70%		75%		
	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт
96,5	673,6	355,8	725,4	301,8	777,2	247,2	829,0
96,4	674,3	354,9	726,1	300,9	778,0	246,3	829,9
96,3	675,0	354,1	726,9	300,0	778,8	245,3	830,7
96,2	675,7	353,2	727,7	299,1	779,6	244,3	831,6
96,1	676,4	352,4	728,4	298,2	780,4	243,3	832,5
96,0	677,1	351,5	729,2	297,2	781,3	242,4	833,3
95,9	677,8	350,7	729,9	296,3	782,1	241,4	834,2
95,8	678,5	349,8	730,7	295,4	782,9	240,4	835,1
95,7	679,2	349,0	731,5	294,5	783,7	239,4	835,9
95,6	679,9	348,2	732,2	293,6	784,5	238,5	836,8
95,5	680,6	347,3	733,0	292,7	785,3	237,5	837,7
95,4	681,3	346,5	733,7	291,8	786,2	236,5	838,6
95,3	682,1	345,6	734,5	290,9	787,0	235,5	839,5
95,2	682,8	344,8	735,3	290,0	787,8	234,5	840,3
95,1	683,5	343,9	736,1	289,0	788,6	233,6	841,2

1 до 96,5% (в мл при температуре 20 °С) и воды, которые 30 до 90 объёмных процентов

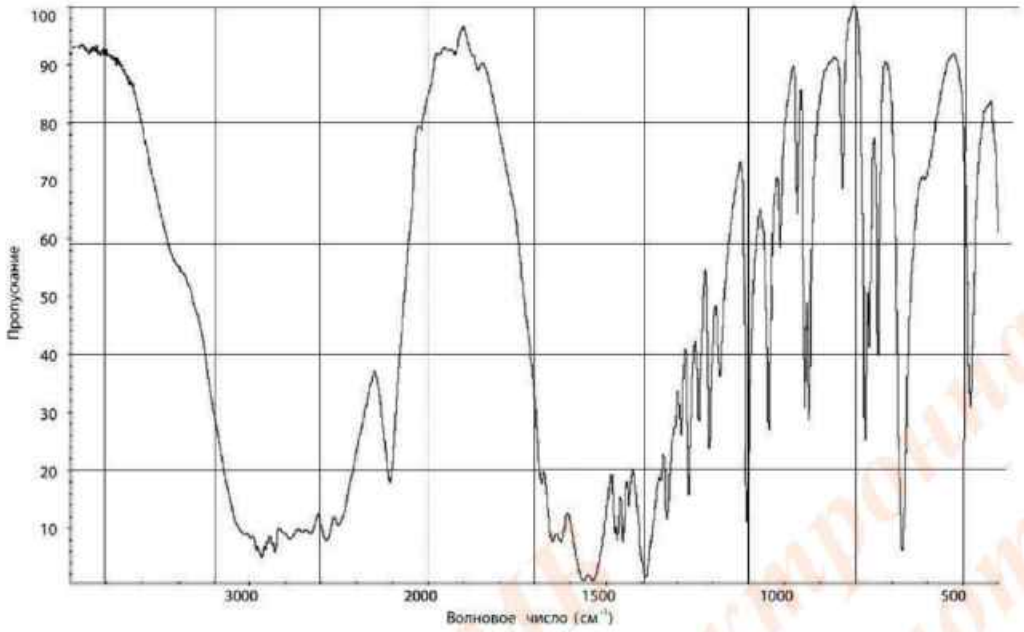
45%		50%		55%		60%	
	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода
	565,0	518,1	513,8	569,9	461,8	621,8	409,1
	564,4	518,7	513,1	570,5	461,1	622,4	408,3
	563,8	519,2	512,5	571,1	460,4	623,1	407,6
	563,2	519,8	511,8	571,7	459,7	623,7	406,8
	562,6	520,3	511,2	572,3	458,9	624,3	406,0
	562,0	520,8	510,5	572,9	458,2	625,0	405,2
	561,5	521,4	509,9	573,5	457,5	625,7	404,4
	560,9	521,9	509,2	574,1	456,8	626,3	403,7
	560,3	522,5	508,6	574,7	456,1	627,0	402,9
	559,7	523,0	507,9	575,3	455,4	627,6	402,1
	559,1	523,6	507,3	575,9	454,7	628,3	401,3
	558,5	524,1	506,6	576,5	453,9	628,9	400,5
	558,0	524,7	506,0	577,1	453,2	629,6	399,7
	557,4	525,2	505,3	577,7	452,5	630,3	399,0
	556,8	525,8	504,7	578,3	451,8	630,9	398,2

Продолжение

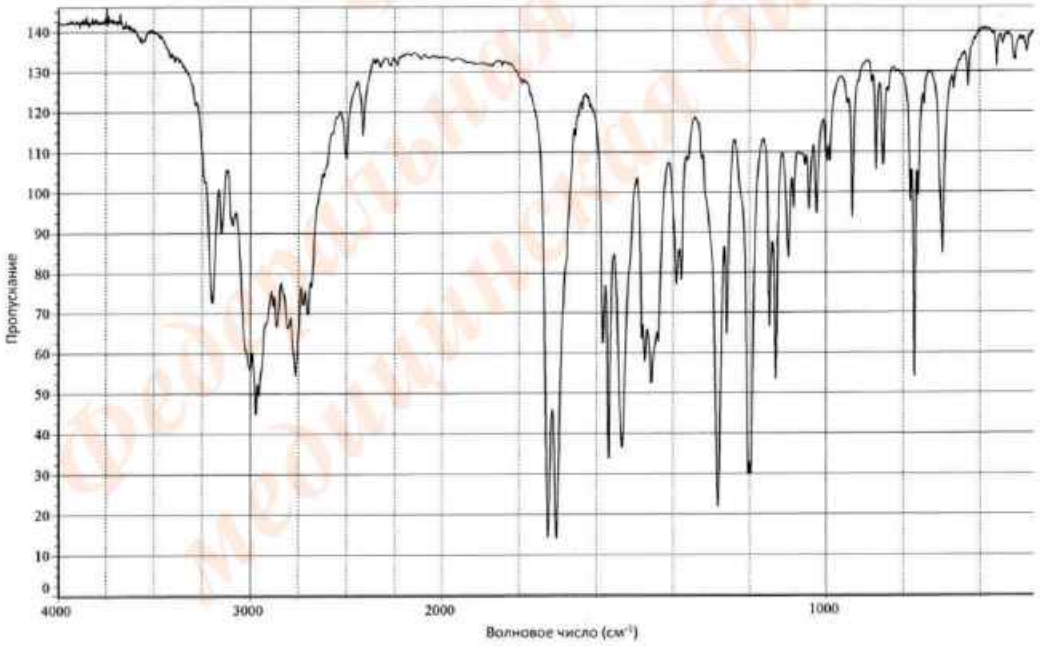
80%		85%		90%		95%	
	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода
	192,0	880,8	135,8	932,6	78,2	984,5	18,6
	190,9	881,7	134,7	933,6	77,1	985,5	17,3
	189,9	882,7	133,6	934,6	75,9	986,5	16,1
	188,8	883,6	132,4	935,6	74,7	987,5	14,9
	187,8	884,5	131,3	936,5	73,6	988,6	13,6
	186,8	885,4	130,2	937,5	72,4	989,6	12,4
	185,7	886,3	129,1	938,5	71,2	990,6	11,2
	184,7	887,3	128,0	939,5	70,0	991,6	9,9
	183,6	888,2	126,9	940,4	68,9	992,7	8,7
	182,6	889,1	125,8	941,4	67,7	993,7	7,5
	181,6	890,1	124,7	942,4	66,5	994,8	6,2
	180,5	891,0	123,6	943,4	65,4	995,8	5,0
	179,5	891,9	122,5	944,4	64,2	996,8	3,7
	178,4	892,9	121,4	945,4	63,0	997,9	2,5
	177,4	893,8	120,3	946,4	61,8	998,9	1,3

ИК-спектры стандартных образцов фармацевтических субстанций

Аминокапроновая кислота

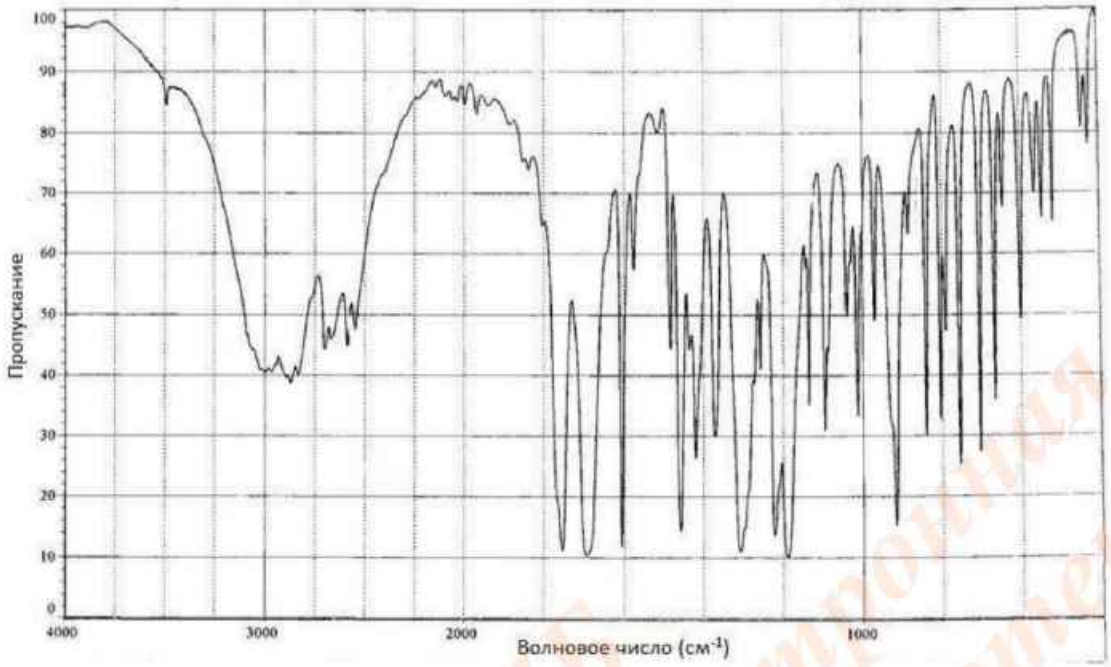


Артикаина гидрохлорид

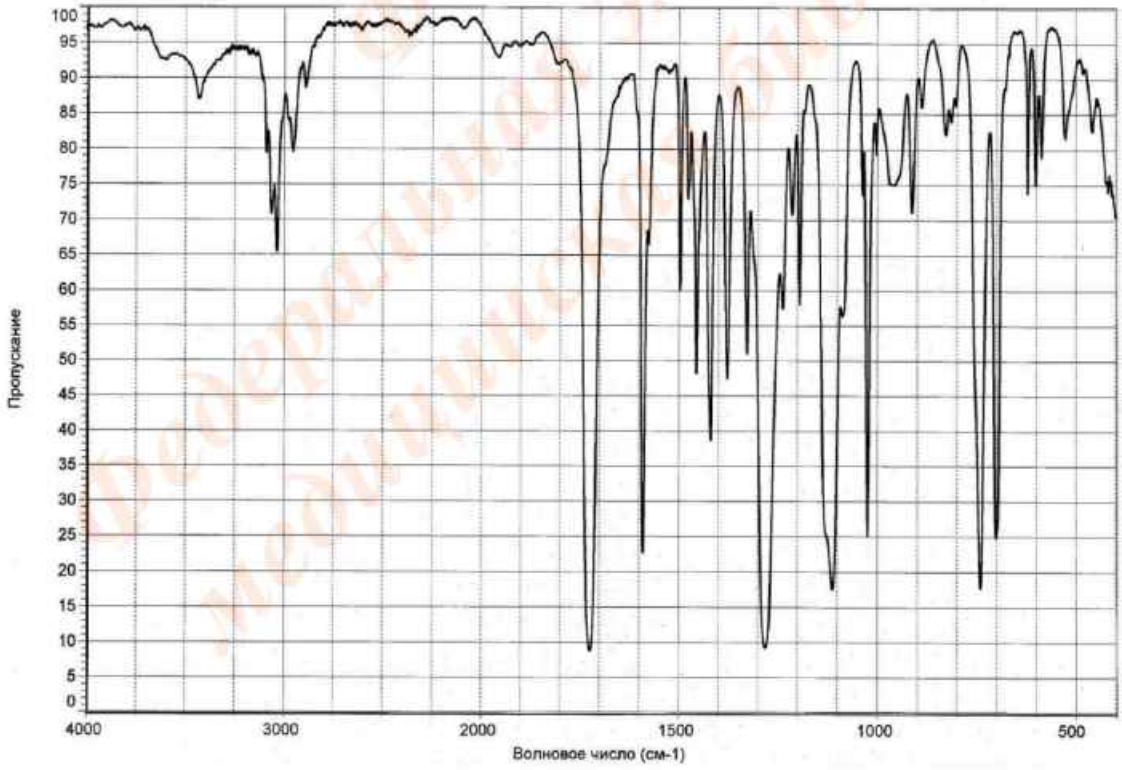


ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Ацетилсалициловая кислота

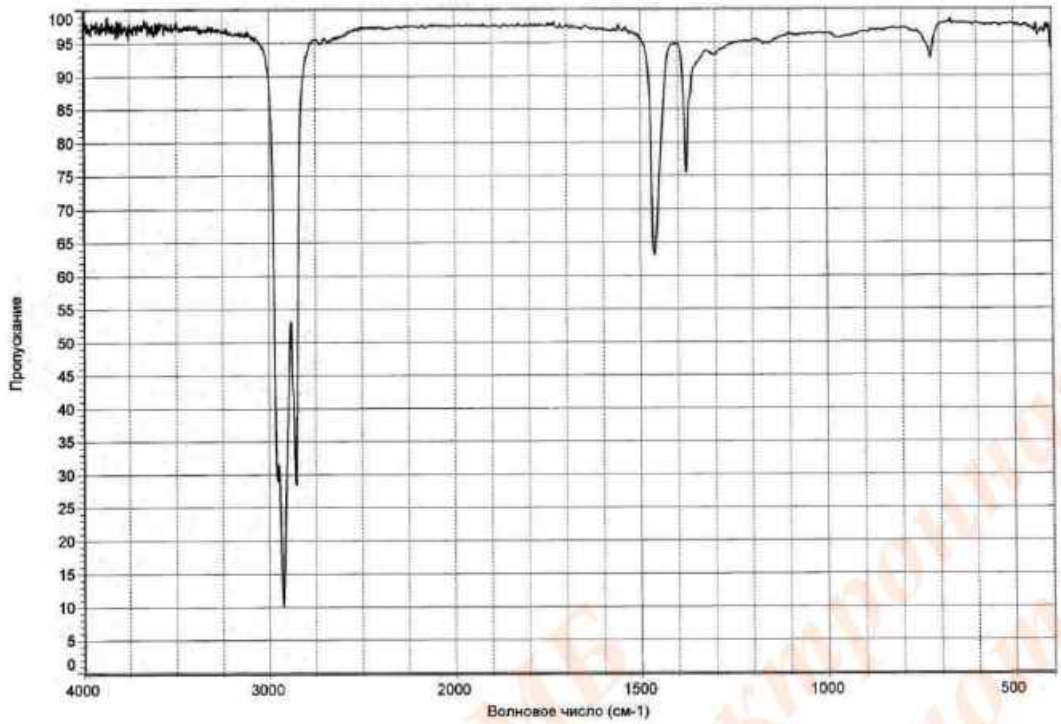


Бензилникотинат

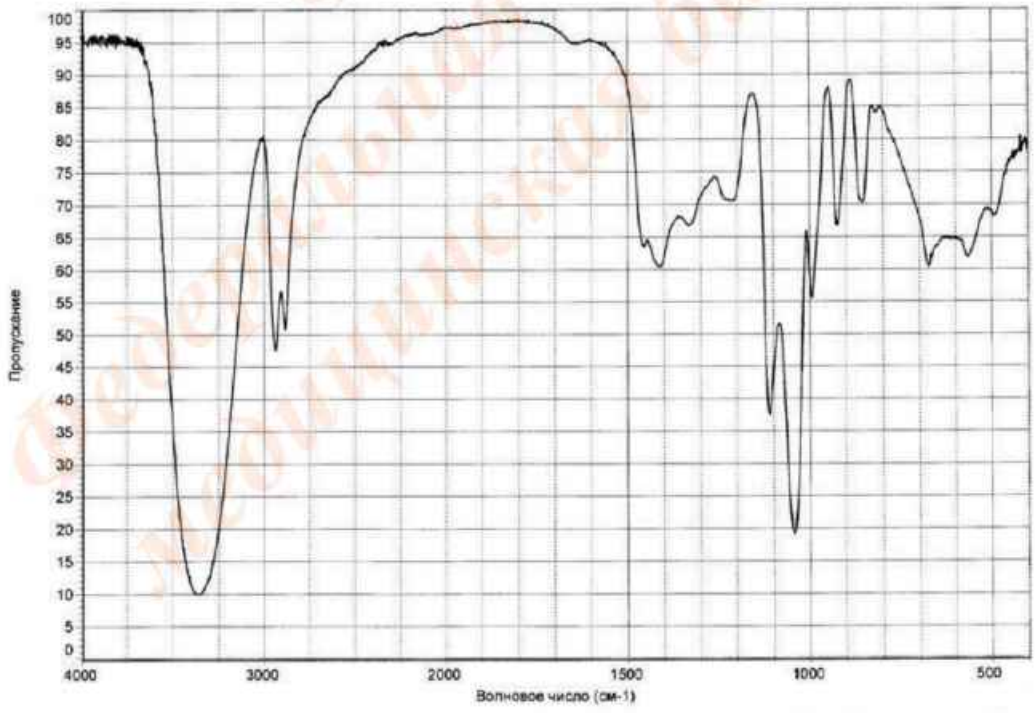


Федеральный электронный медицинский библиотека

Вазелиновое масло

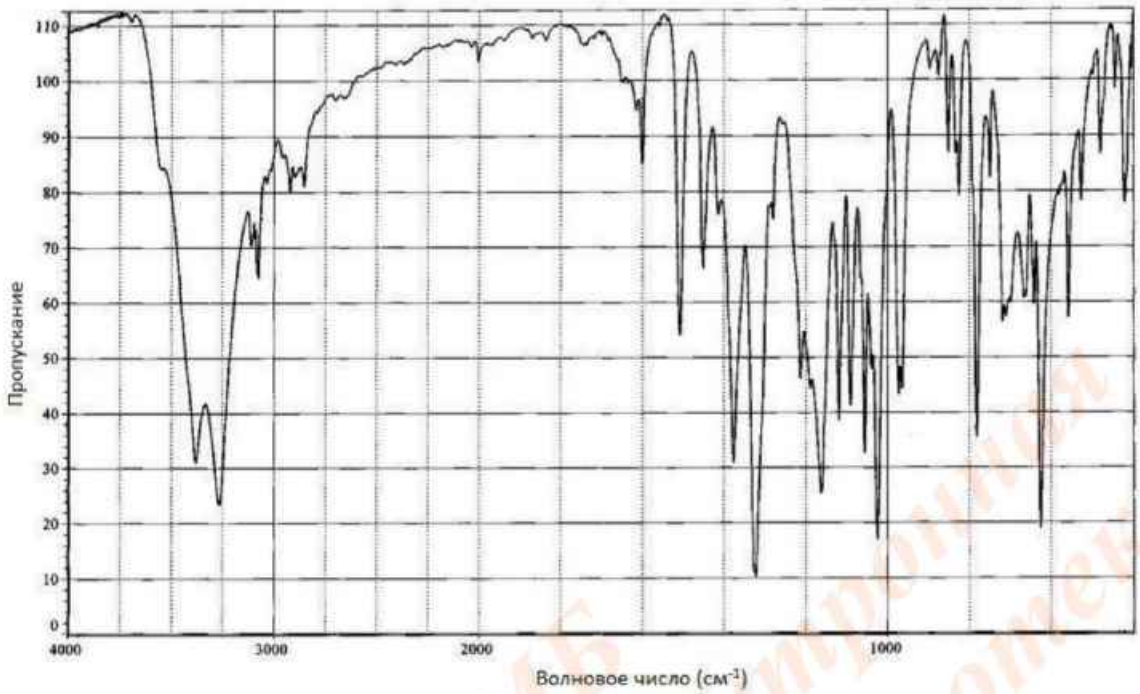


Глицерин

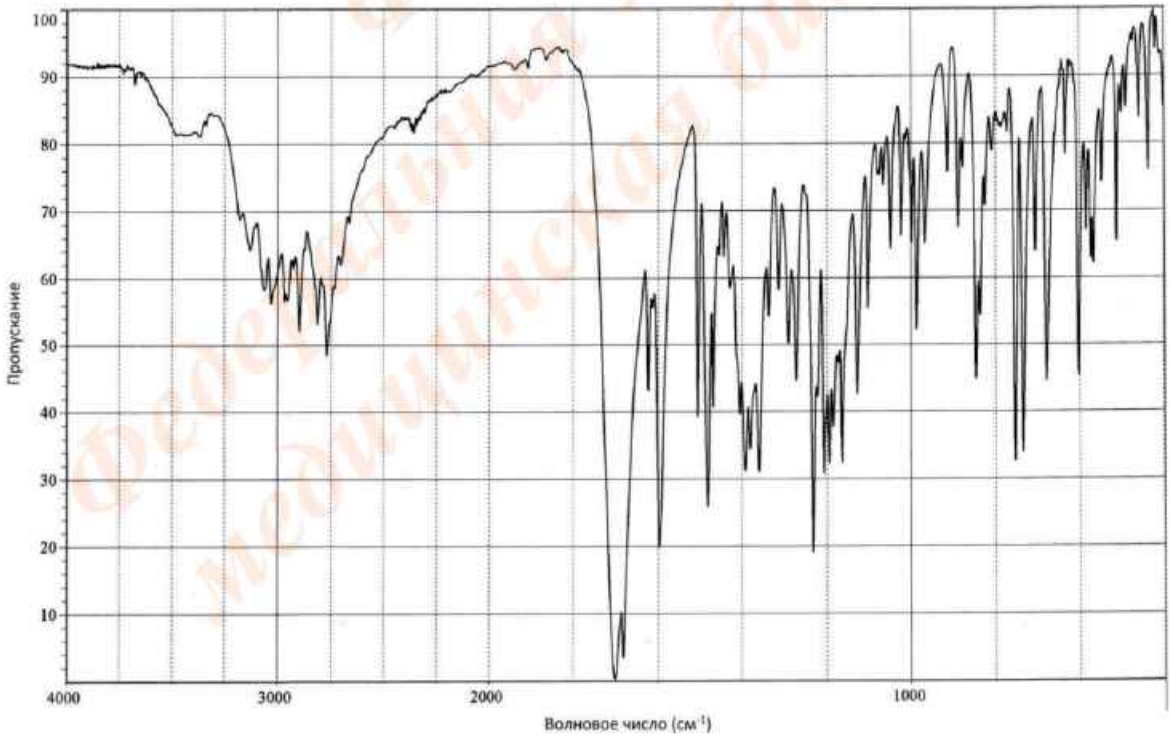


ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Диоксидин

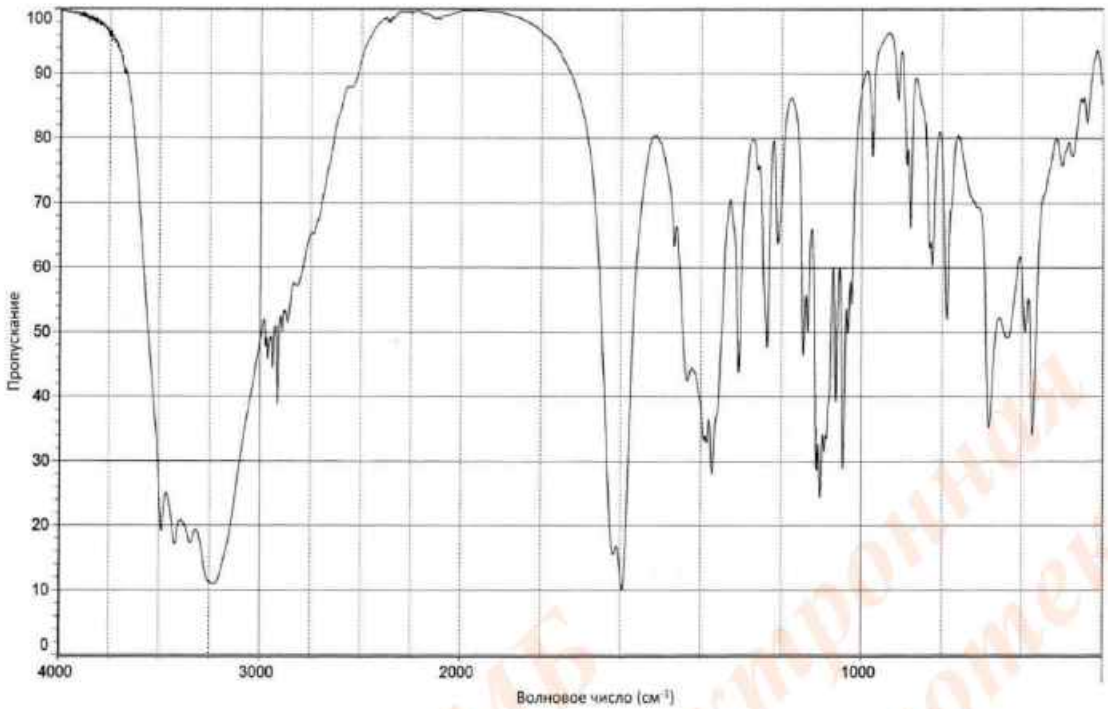


Дроперидол

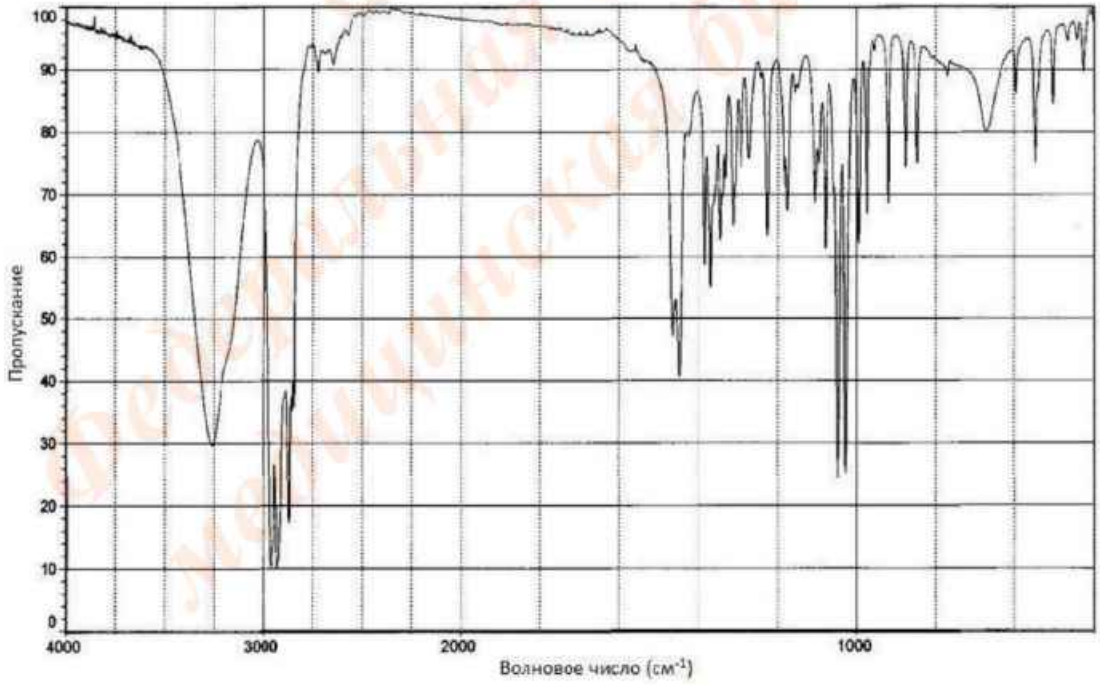


ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Кальция глюконат

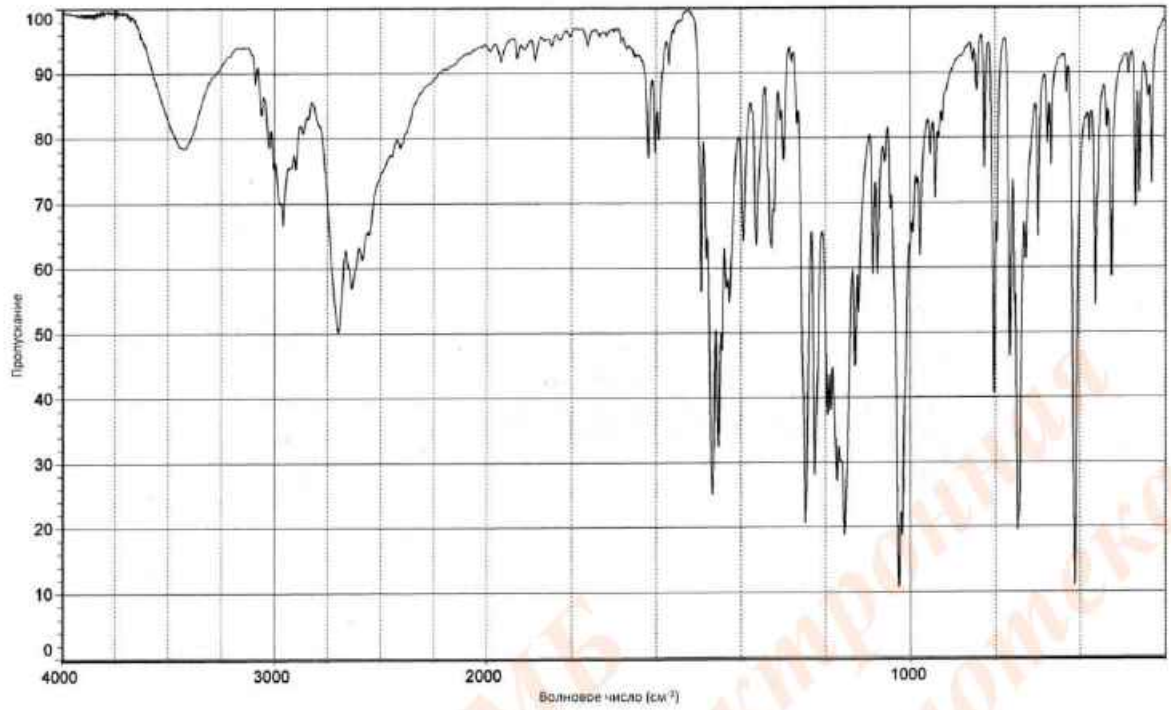


Левоментол

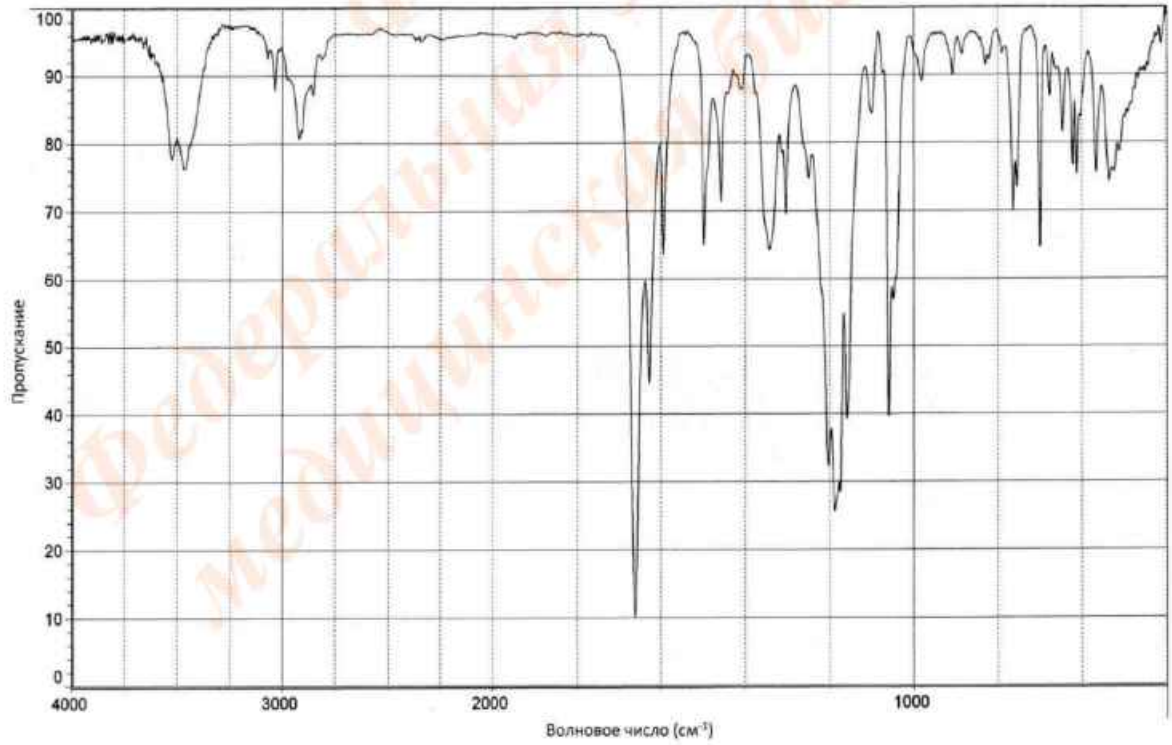


ФЭМБ
Федеральный электронный медицинская библиотека

Мебгидролина нападизилат

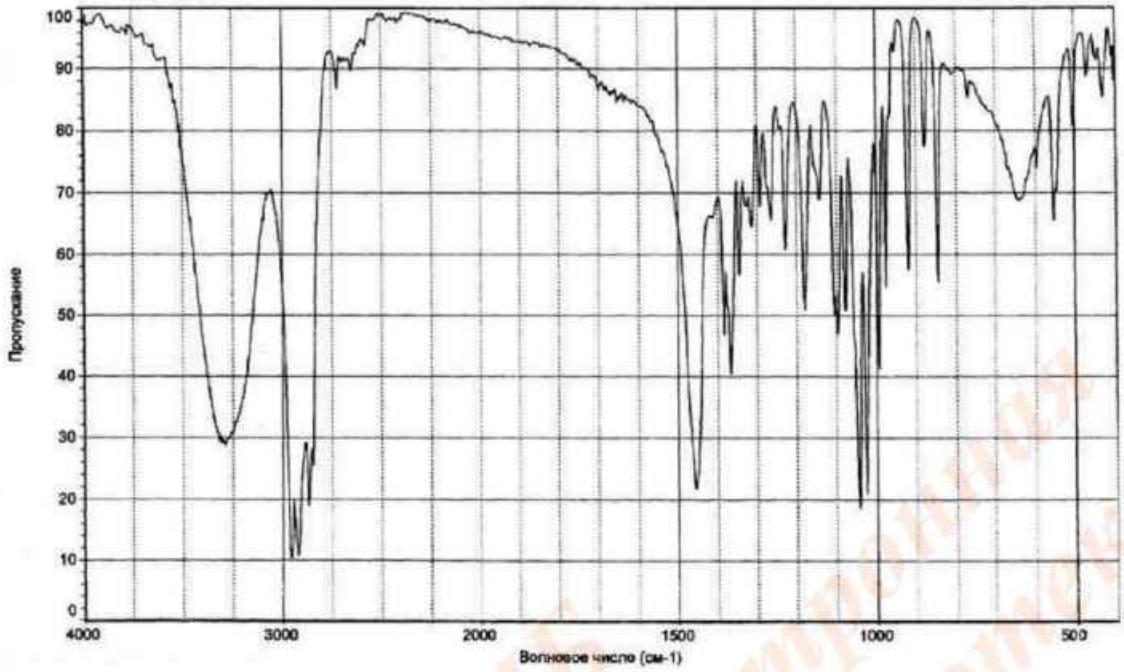


Метамизол натрия

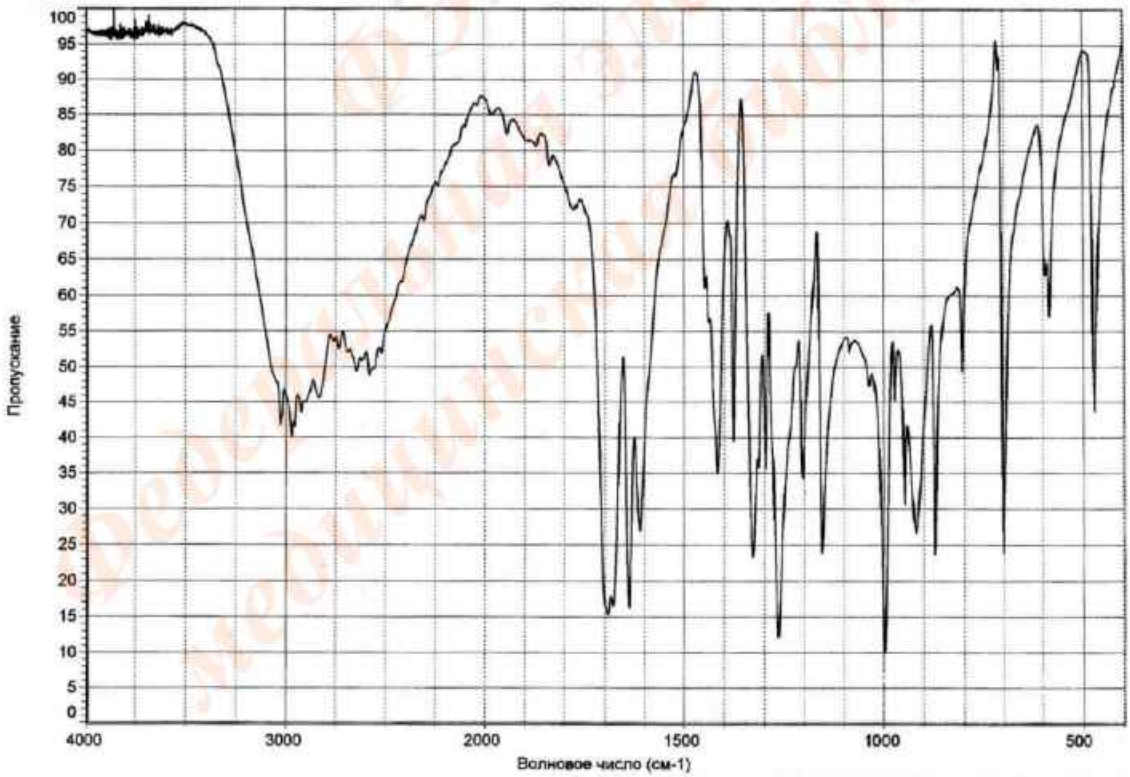


ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Рацементол

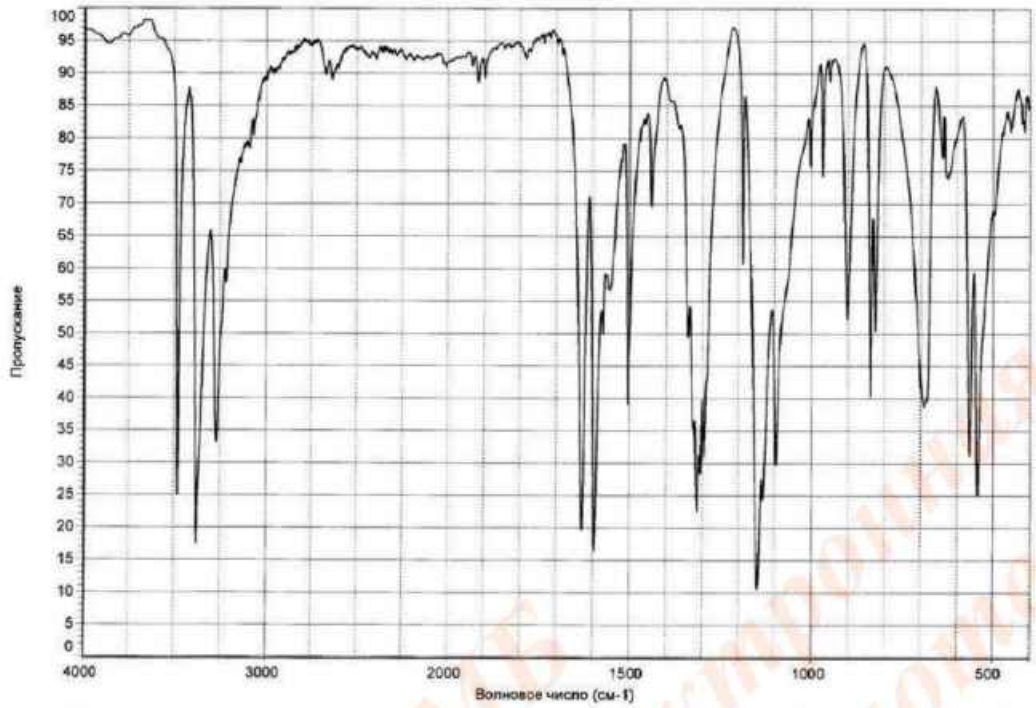


Сорбиновая кислота

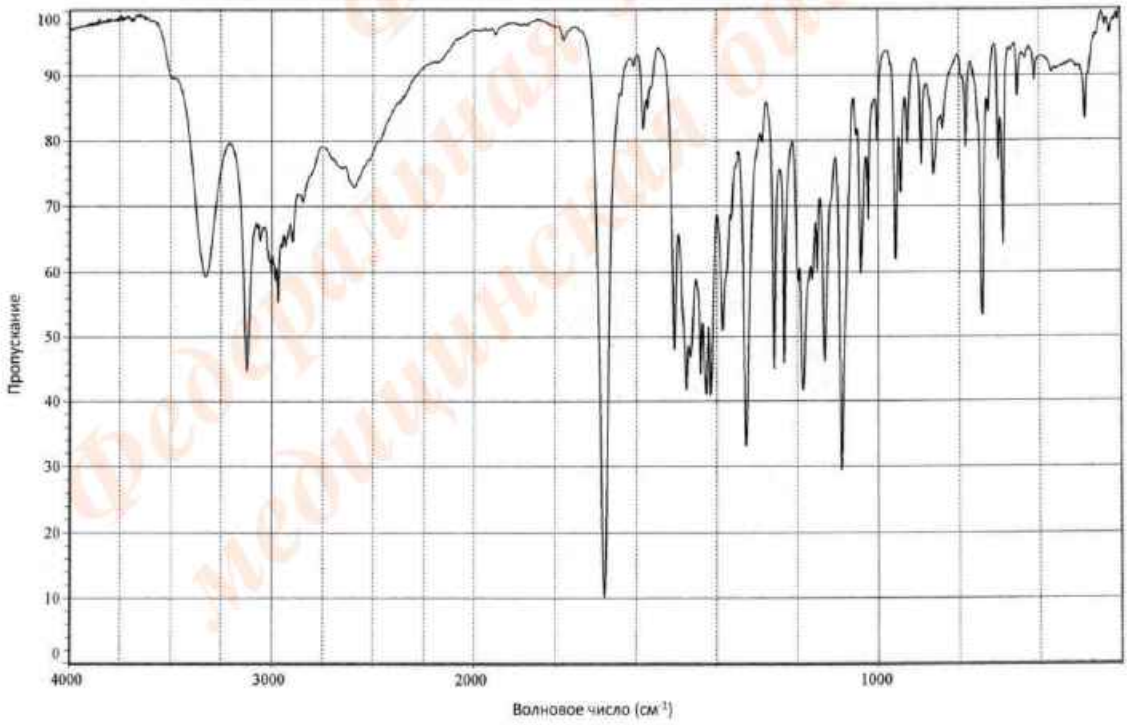


ФЭМБ Федеральный электронный медицинский библиотека

Сульфаниламид

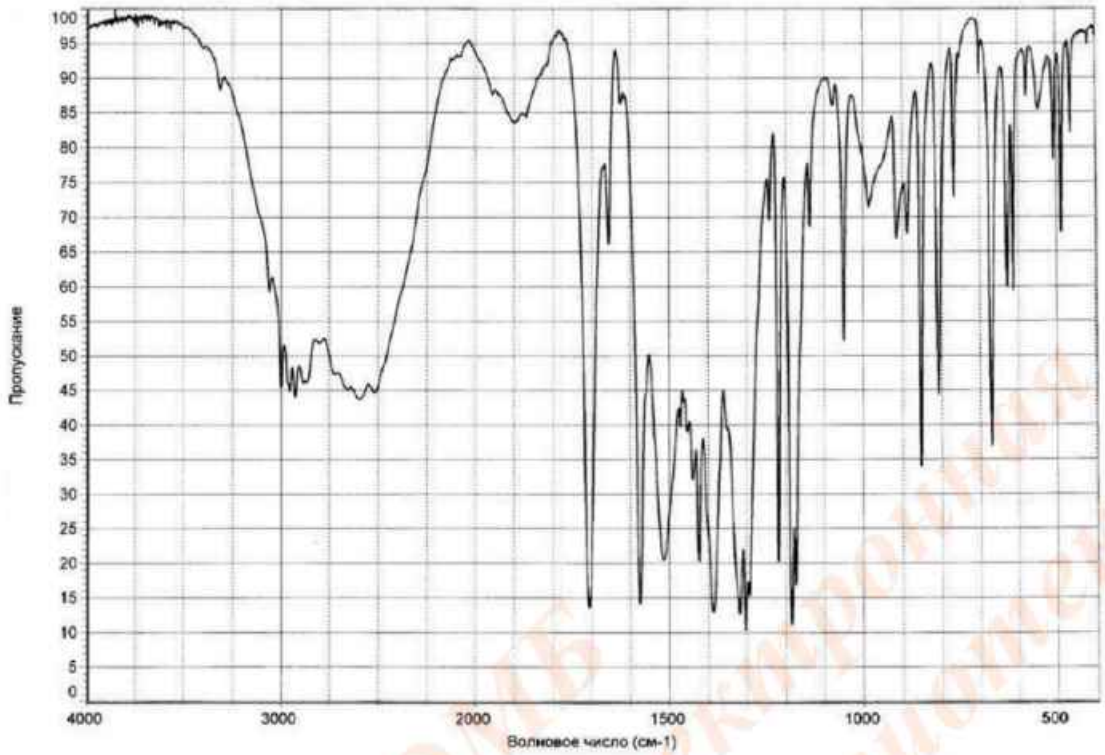


Умифеновира гидрохлорид

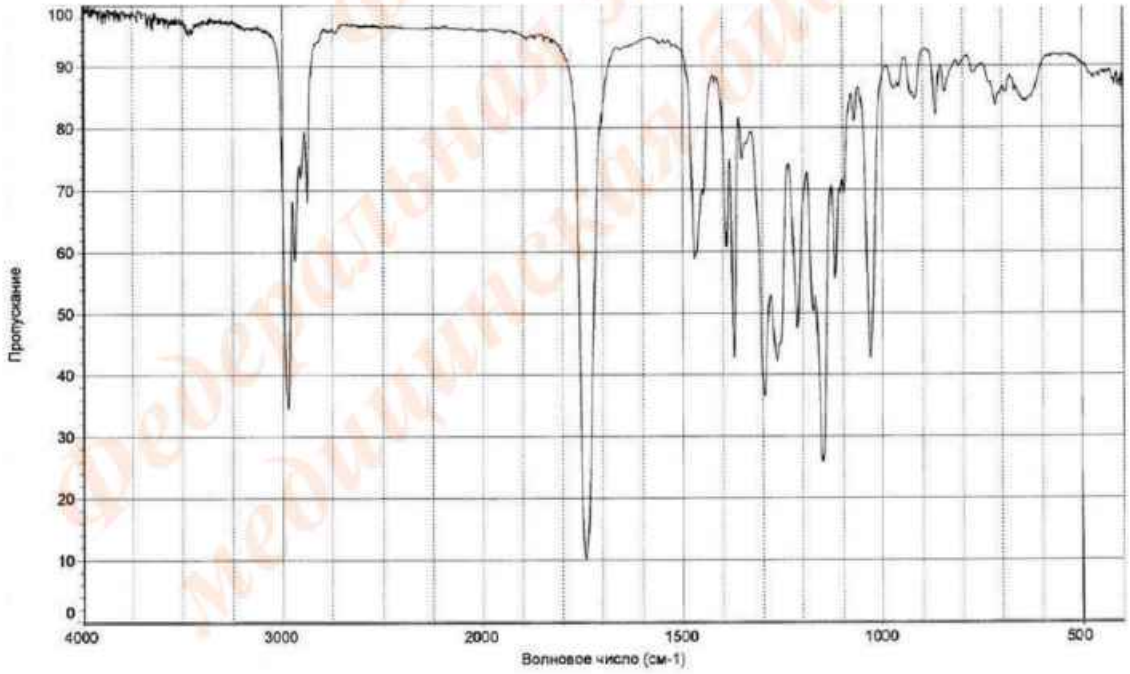


ФБУЗ ЦЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

Этилметилгидроксипиридина сукцинат



Этиловый эфир α-бромизовалериановой кислоты



Федеральный ЭМБ
Медицинская библиотека

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека

ФЭМБ
Федеральная электронная медицинская библиотека