



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/52 (2022.08); A61K 36/28 (2022.08); A61K 31/33 (2022.08); A61K 31/35 (2022.08)

(21)(22) Заявка: 2022120602, 27.07.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
27.07.2022

Дата регистрации:
26.12.2022

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 27.07.2022

(45) Опубликовано: 26.12.2022 Бюл. № 36

Адрес для переписки:

450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3, ФГБОУ ВО
БГМУ МЗ РФ, Кабиров Ильдар Раифович

(72) Автор(ы):

Пупыкина Кира Александровна (RU),
Латыпова Гузель Минулловна (RU),
Шамсутдинова Светлана Рафидовна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "БАШКИРСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ"
Министерства здравоохранения Российской
Федерации (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: ПУПЫКИНА К.А. Разработка
метода стандартизации травы бодяка полевого
по содержанию флавоноидов // Journal of
pharmaceuticals quality assurance issue. (31) 2021.
ЗАГОРУЛЬКО Е.Ю. Количественное
определение суммы флавоноидов в надземной
части и настойке Iris Lactea (Iridaceae) // Химия
растительного сырья. 2018. N 2.
ШАМСУТДИНОВА С.Р. Валидация (см.
прод.)

(54) СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ В ТРАВЕ БОДЯКА ПОЛЕВОГО

(57) Реферат:

Изобретение относится к химико-фармацевтической промышленности, а именно к способу количественного определения суммы флавоноидов в траве бодяка полевого. Заявленный способ включает получение водно-спиртового извлечения из 1 г точной навески измельченной до размера частиц 2 мм травы бодяка полевого 40%-ным спиртом этиловым, при соотношении «сырье-экстрагент» - 1:30, трехкратно по 30 минут, добавление к полученному извлечению 2% спиртового раствора алюминия хлорида в количестве 1 мл для комплексообразования, взаимодействие

проводят в течение 45 минут, количественное определение флавоноидов методом дифференциальной спектрофотометрии с использованием стандартного образца апигенина с алюминия хлоридом при длине волны 389 нм в пересчете на апигенин и абсолютно сухое сырье по формуле

$$X = \frac{A \times a_0 \times 100 \times 1 \times 25 \times 100 \times 100}{A_0 \times a \times 100 \times 25 \times 1 \times (100 - W)},$$

где X - содержание суммы флавоноидов в траве бодяка полевого в пересчете на апигенин и абсолютно сухое сырье, %; A - оптическая

плотность анализируемого раствора; A_0 - оптическая плотность комплекса стандартного образца апигенина с алюминия хлоридом; a - навеска сырья, г; a_0 - навеска стандартного

образца апигенина, г; W - потеря в массе сырья при высушивании, %. Вышеописанный способ обеспечивает повышение точности и упрощение способа. 1 ил., 3 табл., 1 пр.

(56) (продолжение):

методики количественного определения флавоноидов в траве бодяка полевого // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии, №6, Т.24, 2021. RU 2554780 C1, 27.06.2015.

RU 2786835 C1

RU 2786835 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

G01N 33/52 (2006.01)

A61K 36/28 (2006.01)

A61K 31/33 (2006.01)

A61K 31/35 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

G01N 33/52 (2022.08); A61K 36/28 (2022.08); A61K 31/33 (2022.08); A61K 31/35 (2022.08)

(21)(22) Application: 2022120602, 27.07.2022

(24) Effective date for property rights:
27.07.2022Registration date:
26.12.2022

Priority:

(22) Date of filing: 27.07.2022

(45) Date of publication: 26.12.2022 Bull. № 36

Mail address:

450008, g. Ufa, ul. Lenina, 3, FGBOU VO BGMU
MZ RF, Kabirov Ildar Raifovich

(72) Inventor(s):

Pupykina Kira Aleksandrovna (RU),
Latypova Guzel Minullova (RU),
Shamsutdinova Svetlana Rafidovna (RU)

(73) Proprietor(s):

federalnoe gosudarstvennoe biudzhethnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniia «BASHKIRSKII
GOSUDARSTVENNYI MEDITSINSKII
UNIVERSITET» Ministerstva
zdravookhraneniia Rossiiskoi Federatsii (RU)

(54) METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF THE AMOUNT OF FLAVONOIDS IN THE HERB OF THE WILD THISTLE

(57) Abstract:

FIELD: pharmaceutical industry.

SUBSTANCE: claimed method for the quantitative determination of the amount of flavonoids in the herb of the wild thistle includes obtaining a water-alcohol extract from 1 gram of an accurate sample of the herb of the wild thistle, ground to a particle size of 2 mm with 40% ethanol, with a ratio of raw material-extractant 1:30, 3 times for 30 minutes, addition of the obtained extract of 2% alcohol solution of aluminum chloride in the amount of 1 ml. for complex formation, the interaction is carried out for 45 minutes, the quantitative determination of flavonoids by the method for differential spectrophotometry using a standard sample of apigenin with aluminum chloride at a wavelength of 389 nm. In terms of apigenin and absolutely dry raw

materials according to the formula

$$X = \frac{A \times a_0 \times 100 \times 1 \times 25 \times 100 \times 100}{A_0 \times a \times 100 \times 25 \times 1 \times (100 - W)},$$

where X is the content of the sum of flavonoids in the herb of the wild thistle in terms of apigenin and absolutely dry raw materials, %, A – optical density of the solution being analyzed, A₀ – optical density of apigenin standard sample complex with aluminum chloride, a – raw material, g, a₀ – apigenin standard weight, g, W – weight loss on drying, %.

EFFECT: increasing accuracy and simplifying the method.

1 cl, 1 dwg, 3 tab, 1 ex

Изобретение относится к химико-фармацевтической промышленности и может быть использовано в центрах контроля качества лекарственных средств и контрольно-аналитических лабораториях при проведении количественного определения суммы флавоноидов в траве бодяка полевого (*Cirsium arvense* L.).

- 5 Существующая система контроля качества лекарственных препаратов требует постоянного усовершенствования подходов к стандартизации биологически активных соединений (БАС) с использованием современных методов анализа и актуальных данных об их физико-химических, спектральных и фармакологических свойствах, позволяющих объективно и селективно определять содержание целевых веществ
- 10 [Современные подходы к вопросу стандартизации лекарственного растительного сырья / А.Н. Миронов, И.В. Сакаева, Е.И. Саканян и [др.] // Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. - 2013, №2. - С. 52-55.].

- Бодяк полевой (*Cirsium arvense* L.) является одним из видов растений, не включенных в Государственную Фармакопею Российской Федерации XIV издания, но широко
- 15 используемый в народной медицине [Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд. [Электронный ресурс] // Федеральная электронная медицинская библиотека, 2018. - Режим доступа: <http://www.femb.ru.>, Кароматов, И.Д. Использование сорного растения Осот огородный в лечебных целях / И.Д. Кароматов, А.Т. Абдувохидов // Биология и интегративная медицина. 2017. №5. С. 57-62]. В литературе
- 20 описано его применение в народной медицине при лечении различных заболеваний как противовоспалительное, противоязвенное, антиоксидантное, антибактериальное, противоопухолевое, тонизирующее, потогонное средство, его используют при лечении подагры, ревматизма, неврозах, эпилепсии, болезнях пищеварительной системы, наружно при кожных заболеваниях [Губанов, И.А. Иллюстрированный определитель растений
- 25 Средней России. Т. 2. Покрытосеменные. / И.А. Губанов, К.В. Киселева, В.С. Новиков, В.Н. Тихомиров // - М.: Изд-во КМК, Институт технологических исследований, 2003. - 672 с, илл., Жирова, О.С. Род *Cirsium* Hill - Бодяк // Флора Сибири: Asteraceae. - Новосибирск: Наука, 1997. - Т. 13. - С. 213-222, Кароматов, И.Д. Использование сорного растения Осот огородный в лечебных целях / И.Д. Кароматов, А.Т. Абдувохидов //
- 30 Биология и интегративная медицина. 2017. №5. С. 57-62]. Недостаточные сведения о химическом составе, отсутствие нормативной документации на сырье бодяка полевого ограничивают его применение в официальной медицине. Нерешенным остается вопрос стандартизации данного вида сырья.

- Наиболее близким аналогом изобретения является метод количественного
- 35 определения флавоноида линарина в сырье бодяка полевого спектро фотометрическим методом после длительной экстракции (48 час) в аппарате Сокслета спиртом этиловым 70%, затем упариванием спиртового экстракта досуха, растворением его в диметилформамиде (2 час), хроматографированием этого извлечения в системе метанол-этилацетат-вода (5:2:1), элюированием линарина с хроматограммы смесью диоксан-
- 40 вода (1:1) (12 час) и определением оптической плотности раствора при длине волны 334 нм [Рендюк, Т. Д. Изучение растений рода бодяк, как источников получения линарина и акацетина: Дис.канд. фармац. наук - М., 1978. - 113 л.: илл, табл. л. 91-103]. Однако, на наш взгляд, затруднение в количественном определении линарина заключается не только в плохой растворимости самого гликозида, но и в том, что
- 45 методика достаточно сложная и трудно воспроизводимая.

Задачей изобретения является разработка способа количественного определения суммы флавоноидов в траве бодяка полевого, обладающего высокой специфичностью, точностью и воспроизводимостью.

Техническим результатом при использовании изобретения является повышение точности и упрощение способа.

Предлагаемый способ количественного определения суммы флавоноидов в траве бодяка полевого осуществляется следующим образом. Предварительно получают водно-спиртовое извлечение из растительного сырья путем экстракции 1 г точной навески измельченного до размера частиц 2 мм травы бодяка полевого 40%-ным спиртом этиловым, при соотношении «сырье-экстрагент» - 1:30, трехкратно по 30 минут. Затем к водно-спиртовому извлечению добавляют 2% спиртовой раствор алюминия хлорида в количестве 1 мл для комплексобразования, взаимодействие проводят в течение 45 минут. Количественное определение флавоноидов проводят методом дифференциальной спектрофотометрии с использованием стандартного образца апигенина с алюминия хлоридом при длине волны 389 нм в пересчете на апигенин и абсолютно сухое сырье по формуле:

$$X = \frac{A \times a_0 \times 100 \times 1 \times 25 \times 100 \times 100}{A_0 \times a \times 100 \times 25 \times 1 \times (100 - W)},$$

где:

X - содержание суммы флавоноидов в траве бодяка полевого в пересчете на апигенин и абсолютно сухое сырье, %;

A - оптическая плотность анализируемого раствора;

A₀ - оптическая плотность комплекса стандартного образца апигенина с алюминия хлоридом;

a - навеска сырья, г;

a₀ - навеска стандартного образца апигенина, г;

W - потеря в массе сырья при высушивании, %.

При изучении спектральных характеристик было выявлено, что именно апигенин определяет характер кривой поглощения водно-спиртового извлечения в траве бодяка полевого. Было установлено, что спектр поглощения травы бодяка полевого имеет близкий максимум к спектру апигенина ($\lambda_{\max}=389$ нм), поэтому этот флавоноид был выбран в качестве основного в сумме, на который в дальнейшем предлагается вести пересчет. На фигуре 1 представлены дифференциальные спектры поглощения, где кривая 1 - стандартное вещество апигенин, кривая 2 - извлечения из травы бодяка полевого с добавлением раствора алюминия хлорида ($\lambda_{\max}=389$ нм).

Данный факт позволяет проводить количественное определение суммы флавоноидов в траве бодяка полевого методом дифференциальной спектрофотометрии при аналитической длине волны 389 нм.

Также нами были изучены условия экстракции флавоноидов, обеспечивающих максимальный их выход из сырья бодяка полевого, а именно: концентрация экстрагента, измельченность сырья, так как размер частиц сырья влияет на полноту и скорость перехода в раствор исследуемых веществ, соотношение сырья и экстрагента, время и кратность экстракции.

При сравнительной оценке влияния экстрагента на выход флавоноидов был использован спирт этиловый различной концентрации. В таблице 1 представлена зависимость выхода суммы флавоноидов травы бодяка полевого от концентрации экстрагента. В ходе проведения эксперимента установлено, что оптимальным экстрагентом, при использовании которого наблюдались более высокие показатели содержания флавоноидов, является спирт этиловый 40%, который и был выбран для дальнейших исследований.

В таблице 2 представлены результаты исследований по выбору степени измельченности сырья, времени экстракции, соотношения сырья и экстрагента, кратности экстракции. Нами установлено, что оптимальной является измельченность сырья до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм, время экстракции, при котором происходит максимальное извлечение флавоноидов, - 30 минут, соотношение сырья и экстрагента - 1:30 и трехкратная экстракция обеспечивают наиболее полное извлечение флавоноидов из сырья бодяка полевого.

Также нами определены оптимальные параметры влияния комплексообразователя на концентрацию флавоноидов, были изучены концентрация спиртового раствора алюминия хлорида и его количество, добавляемое к извлечению. Результаты исследований представлены в таблице 3. Установлено, что наиболее оптимальным является использование 2% раствора алюминия хлорида в количестве 1 мл, реакция комплексообразования развивается в течение 45 минут и комплекс остается стабильным в течение часа.

Способ реализуется следующим образом.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм. Около 1 г (точная навеска) сырья помещают в колбу термостойкого стекла со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 30 мл 40% спирта этилового, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 минут. Затем полученное извлечение осторожно фильтруют через вату в мерную колбу на 100 мл, избегая попадания частиц сырья в воронку. К оставшемуся в колбе сырью прибавляют 30 мл 40% спирта этилового и вату, через которую фильтровали, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане еще 30 минут. Содержимое колбы фильтруют в мерную колбу с первой порцией извлечения через вату. Процесс повторяют еще один раз по вышеизложенной схеме. Полученное извлечение доводят в мерной колбе до 100 мл этим же растворителем (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 1 мл раствора А, прибавляют 1 мл 2% спиртового раствора хлорида алюминия и доводят раствор до метки 95% этиловым спиртом (раствор В). Через 45 минут измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 389 нм в кювете толщиной слоя 1 см. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл раствора А, 1 мл 3% кислоты уксусной, доведенный 95% этиловым спиртом до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность комплекса раствора стандартного образца апигенина с раствором алюминия хлорида: к 1 мл 0,05% раствора апигенина прибавляют 1 мл 2% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят раствор этиловым спиртом 95% до 25 мл в мерной колбе. Измерения проводят аналогично испытуемому раствору.

Содержание суммы флавоноидов (X) в пересчете на апигенин и абсолютно сухое сырье (в %) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \times a_0 \times 100 \times 1 \times 25 \times 100 \times 100}{A_0 \times a \times 100 \times 25 \times 1 \times (100 - W)},$$

где:

X - содержание суммы флавоноидов в траве бодяка полевого в пересчете на апигенин и абсолютно сухое сырье, %;

A - оптическая плотность анализируемого раствора (раствор В);

A₀ - оптическая плотность комплекса стандартного образца апигенина с алюминия

хлоридом;

а - навеска сырья, г;

a_0 - навеска стандартного образца апигенина, г;

W - потеря в массе сырья при высушивании, %>.

5 Предлагаемый способ поясняется следующим примером.

Аналитическую пробу сырья бодяка полевого (заготовленного в Республике Башкортостан, 2019 г.) измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм. Около 0,9990 г (точная навеска) сырья помещают в колбу термостойкого стекла со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 30 мл 40% спирта этилового, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 минут. Затем полученное извлечение осторожно фильтруют через вату в мерную колбу на 100 мл, избегая попадания частиц сырья в воронку. К оставшемуся в колбе сырью прибавляют 30 мл 40% спирта этилового и вату, через которую фильтровали, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане еще 30 минут. Содержимое колбы фильтруют в мерную колбу с первой порцией извлечения через вату. Процесс повторяют еще один раз по вышеизложенной схеме. Полученное извлечение доводят в мерной колбе до 100 мл этим же растворителем (раствор А). В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 1 мл раствора А, прибавляют 1 мл 2% спиртового раствора хлорида алюминия и доводят раствор до метки 95% этиловым спиртом (раствор В). Через 45 минут измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 389 нм в кювете толщиной слоя 1 см. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл раствора А, 1 мл 3% кислоты уксусной, доведенный 95% этиловым спиртом до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл. Параллельно измеряют оптическую плотность комплекса раствора стандартного образца апигенина с раствором алюминия хлорида: к 1 мл 0,05% раствора апигенина прибавляют 1 мл 2% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят раствор этиловым спиртом 95% до 25 мл в мерной колбе. Измерения проводят аналогично испытуемому раствору. Содержание суммы флавоноидов (X) в пересчете на апигенин и абсолютно сухое сырье (в %) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{0,425 \times 0,05 \times 100 \times 1 \times 25 \times 100 \times 100}{0,799 \times 0,9990 \times 100 \times 25 \times 1 \times (100 - 7,6)},$$

где:

35 0,415 - оптическая плотность анализируемого раствора (раствор В);

0,799 - оптическая плотность комплекса стандартного образца апигенина с алюминия хлоридом;

0,9990 - навеска сырья в граммах;

0,05 - навеска стандартного образца апигенина в граммах;

40 7,6 - потеря в массе сырья при высушивании, %.

X=2,88%.

Все результаты были статистически обработаны. Ошибка единичного количественного определения составила $\pm 3,13\%$, что не превышает предельно допустимых значений.

45 Таким образом, предлагаемый способ количественного определения суммы флавоноидов в траве бодяка полевого методом дифференциальной спектрофотометрии с использованием стандартного образца апигенина разработан впервые для данного вида сырья и обладает следующими преимуществами:

1. Разработанный метод является специфичным и селективным, а также позволяет проводить экстракцию сырья трехкратно 40% этиловым спиртом, позволяющим исчерпывающе извлекать целевые вещества (флавоноиды).

2. Пересчет суммы флавоноидов идет на специфическое для травы бодяка полевого вещество - апигенин, определяющее характер кривой поглощения в УФ - спектре испытуемого раствора (длина волны 389 нм).

3. Ошибка единичного определения предлагаемого способа составляет $\pm 3,13\%$, что свидетельствует об объективности разработанного способа.

4. Разработанный способ позволяет исключить пробоподготовку, заключающуюся в обработке экстракта токсическими растворителями.

Этот способ можно применять в центрах контроля качества лекарственных средств, на фармацевтических предприятиях и контрольно-аналитических лабораториях при проведении количественного анализа травы бодяка полевого (*Cirsium arvense* L.).

(57) Формула изобретения

Способ количественного определения суммы флавоноидов в траве бодяка полевого, включающий водно-спиртовую экстракцию измельченной травы бодяка полевого, взаимодействие с растворителем, измерение оптической плотности и расчет содержания суммы флавоноидов, отличающийся тем, что проводят экстракцию измельченной до размера частиц 2 мм травы бодяка полевого 40%-ным спиртом этиловым при соотношении сырье : экстрагент 1:30, трехкратно по 30 минут, взаимодействие проводят с 2% спиртовым раствором алюминия хлорида в количестве 1 мл в течение 45 минут, после чего оптическую плотность раствора измеряют при длине волны 389 нм с использованием стандартного образца апигенина с алюминия хлоридом, а содержание суммы флавоноидов в траве бодяка полевого рассчитывают в пересчете на апигенин и абсолютно сухое сырье по формуле

$$X = \frac{A \times a_0 \times 100 \times 1 \times 25 \times 100 \times 100}{A_0 \times a \times 100 \times 25 \times 1 \times (100 - W)},$$

где X - содержание суммы флавоноидов в траве бодяка полевого в пересчете на апигенин и абсолютно сухое сырье, %;

A - оптическая плотность анализируемого раствора;

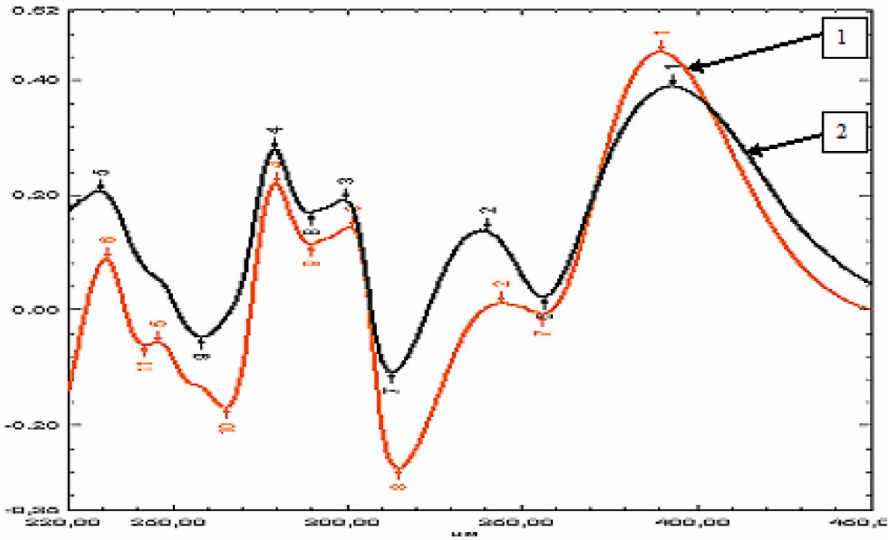
A₀ - оптическая плотность комплекса стандартного образца апигенина с алюминия хлоридом;

a - навеска сырья, г;

a₀ - навеска стандартного образца апигенина, г;

W - потеря в массе сырья при высушивании, %.

1



Фиг.1

2

Таблица 1

Влияние экстрагента на выход флавоноидов

Концентрация спирта этилового	Содержание флавоноидов, %
40%	2,89±0,14
50%	2,73±0,12
70%	2,68±0,11
80%	2,51±0,09
90%	2,46±0,07

Таблица 2

Влияние параметров экстракции на выход флавоноидов

Наименование параметра	Содержание флавоноидов, %	
Измельченность сырья, мм		
1 мм	2,77±0,13	
2 мм	2,84±0,18	
3 мм	2,69±0,10	
Время экстракции, мин		
15	2,64±0,07	
30	2,88±0,12	
45	2,75±0,09	
60	2,59±0,07	
90	2,39±0,04	
Соотношение сырья и экстрагента		
1:30	2,84±0,12	
1:50	2,77±0,10	
1:100	2,68±0,08	
Кратность экстракции		
1:30	однократная	2,72±0,03
	двукратная	2,88±0,05
	трехкратная	2,92±0,06
1:50	однократная	2,64±0,04
	двукратная	2,75±0,07
	трехкратная	2,79±0,11
1:100	однократная	2,59±0,04
	двукратная	2,62±0,05
	трехкратная	2,68±0,02

Таблица 3

Влияние комплексообразователя на выход флавоноидов

Исследуемый образец	Содержание флавоноидов, %				
	Концентрация алюминия хлорида				
	1%	2%	3%	5%	10%
Трава бодяка	2,63±0,09	2,78±0,12	2,66±0,10	2,54±0,08	2,48±0,09
	Количество добавляемого алюминия хлорида				
	1 мл	2 мл	3 мл	5 мл	10 мл
	2,80±0,11	2,68±0,09	2,54 ±0,08	2,51±0,06	2,44 ±0,05