



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК  
G01N 33/15 (2023.08); A61K 36/734 (2023.08)

(21)(22) Заявка: 2023129754, 16.11.2023

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
16.11.2023

Дата регистрации:  
01.02.2024

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 16.11.2023

(45) Опубликовано: 01.02.2024 Бюл. № 4

Адрес для переписки:

450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3, ФГБОУ ВО  
"БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ"  
Министерства здравоохранения РФ, Ахатов  
Искандер Шаукатович

(72) Автор(ы):

Кудашкина Наталья Владимировна (RU),  
Хасанова Светлана Рашитовна (RU),  
Шубина Татьяна Викторовна (RU),  
Галиахметова Рената Ринатовна (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: RU 2012130664 А, 17.07.2012. RU  
2531940 С1, 27.10.2014. RU 2695760 С1,  
25.07.2019. RU 2747483 С1, 05.05.2021. Federico  
Feroli et al., Application of different analytical  
methods for the determination of phenolics and  
antioxidant activity in hawthorn (*Crataegus* spp.)  
bud and sprout herbal extracts, *Journal of Applied  
Botany and Food Quality* 93, 1 (см. прод.)

## (54) СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГИДРОКСИКОРИЧНЫХ КИСЛОТ В ПОБЕГАХ БОЯРЫШНИКА КРУПНОКОЛЮЧКОВОГО

(57) Реферат:

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 гидроксикоричных кислот в побегах боярышника крупноколочкового (*Crataegus macracantha*). Побеги боярышника крупноколочкового измельчают до частиц 4 мм, проводят экстракцию 60% этиловым спиртом, в соотношении «сырье-экстракт» - 1:200. Затем измеряют оптическую плотность раствора при длине волны 330 нм. После этого содержание суммы

гидроксикоричных кислот в побегах боярышника крупноколочкового в пересчете на хлорогеновую кислоту вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \times 100 \times 25 \times 100}{m \times 2 \times 507 \times (100 - W)};$$

где: X - сумма

гидроксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту, %; A - оптическая плотность испытуемого раствора; m - масса сырья, г; W - потеря в массе при высушивании, %; 507 - удельный показатель поглощения государственного стандартного образца хлорогеновой кислоты при 330 нм. Использование изобретения обеспечивает

повышение точности способа. 1 ил., 4 табл., 1 пр.

(56) (продолжение):

- 10 (2020). Гончаров Н.Ф. и др., ГИДРОКСИКОРИЧНЫЕ КИСЛОТЫ ЦВЕТКОВ И ЛИСТЬЕВ НЕФАРМАКОПЕЙНЫХ ВИДОВ РОДА БОЯРЫШНИК // *Фундаментальные исследования*. - 2011. No 9-1, стр. 146-148; <https://fundamental-research.ru/ru/article/view?id=28113>. Трофимова, Светлана Валерьевна, Фармакогностическое изучение листьев боярышника кроваво-красного *Crataegus sanguinea* Pall. из флоры Башкортостана, автореферат диссерт., Пермь, 2014 г.

R U 2 8 1 2 7 3 7 C 1

R U 2 8 1 2 7 3 7 C 1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*G01N 33/15* (2006.01)  
*A61K 36/734* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC  
*G01N 33/15 (2023.08); A61K 36/734 (2023.08)*

(21)(22) Application: **2023129754, 16.11.2023**

(24) Effective date for property rights:  
**16.11.2023**

Registration date:  
**01.02.2024**

Priority:

(22) Date of filing: **16.11.2023**

(45) Date of publication: **01.02.2024** Bull. № 4

Mail address:

**450008, g. Ufa, ul. Lenina, 3, FGBOU VO  
"BASHKIRSKIY GOSUDARSTVENNYJ  
MEDITSINSKIY UNIVERSITET" Ministerstva  
zdravookhraneniya RF, Akhatov Iskander  
Shaukatovich**

(72) Inventor(s):

**Kudashkina Natalia Vladimirovna (RU),  
Khasanova Svetlana Rashitovna (RU),  
Shubina Tatiana Viktorovna (RU),  
Galiakhmetova Renata Rinatovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe biudzhethnoe  
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego  
obrazovaniia «BASHKIRSKII  
GOSUDARSTVENNYI MEDITSINSKIY  
UNIVERSITET» Ministerstva  
zdravookhraneniia Rossiiskoi Federatsii (RU)**

(54) **METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF HYDROXYCINMAN ACIDS IN SHOOTS OF HAWTOWN**

(57) Abstract:

FIELD: chemical; pharmaceutical industry.

SUBSTANCE: invention can be used in medicinal product quality control centres and control and analytical laboratories when conducting a quantitative determination of the amount of hydroxycinnamic acids in the shoots of large-thorn hawthorn (*Crataegus macracantha*). Large-thorned hawthorn shoots are crushed to particles of 4 mm, extraction is carried out with 60% ethyl alcohol, in a raw material-extractant ratio of 1:200. Then the optical density of the solution is measured at a wavelength of 330 nm. After this, the content of the sum of hydroxycinnamic acids in the

shoots of large-thorned hawthorn in terms of chlorogenic acid is calculated using the formula:  $X = (A \times 100 \times 25 \times 100) / (m \times 2 \times 507 \times (100 - W))$ , where: X is the sum of hydroxycinnamic acids in terms of chlorogenic acid, %; A is the optical density of the test solution; m is mass of raw materials, g; W is weight loss during drying, %; 507 is the specific absorbance of the state standard sample of chlorogenic acid at 330 nm.

EFFECT: use of the invention improves prediction accuracy.

1 cl, 1 dwg, 4 tbl, 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 гидроксикоричных кислот в побегах боярышника крупноколочкового (*Crataegus macracantha*).

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

В настоящее время большой интерес проявляется к североамериканским видам рода *Crataegus* L. (Rosaceae), которые широко интродуцируются в России. К данному виду относится боярышник крупноколочковый, который, по нашему мнению, является перспективным источником биологически активных веществ (БАВ). Одной из целевых групп биологически активных веществ, содержащихся в боярышнике крупноколочковом и представляющих практический интерес, является группа гидроксикоричных кислот.

Важнейший представитель данной группы - хлорогеновая кислота. Стоит отметить широкий спектр фармакологических свойств хлорогеновой кислоты, таких как антиоксидантное, противовоспалительное, антибактериальное, противовирусное, гипогликемическое, гиполипидемическое, антикардиоваскулярное, антимуtagenное, противораковое, иммуномодулирующее [Miao M, Xiang L. Pharmacological action and potential targets of chlorogenic acid. *Adv Pharmacol.* 2020;87:71-88. doi: 10.1016/bs.apha.2019.12.002. Epub 2020 Feb 7. PMID: 32089239.] Имеются данные о том, что хлорогеновая кислота участвует в регуляции метаболизма липидов и глюкозы и, таким образом, может использоваться для лечения многих заболеваний, таких как сердечно-сосудистые заболевания, диабет, стеатоз печени и ожирение [Naveed M, Hejazi V, Abbas M, Kamboh AA, Khan GJ, Shumzaid M, Ahmad F, Babazadeh D, FangFang X, Modarresi-Ghazani F, WenHua L, XiaoHui Z. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomed Pharmacother.* 2018 Jan97:67-74. doi: 10.1016/j.biopha.2017.10.064. Epub 2017 Nov 6. PMID: 29080460.] Все это подтверждает целесообразность выделения, идентификации и дальнейших исследований хлорогеновой кислоты, содержащейся в побегах боярышника крупноколочкового с целью расширения ассортимента лекарственных средств растительного происхождения.

На данный момент отсутствуют единые методики количественного определения суммы гидроксикоричных кислот в лекарственном растительном сырье [Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Москва, 2018 г.]

Однако, опираясь на имеющиеся данные фармакопейных методик анализа БАВ в плодах, а также цветках боярышника, и исходя из данных о химическом составе побегов боярышника крупноколочкового, предполагается, что будет рациональным использовать спектрофотометрический метод для определения концентрации гидроксикоричных кислот в побегах боярышника крупноколочкового в пересчете на хлорогеновую кислоту, как на представителя гидроксикоричных кислот.

Наиболее близким аналогом изобретения является способ количественного определения суммы гидроксикоричных кислот в подземных органах сабельника болотного, включающий экстракцию измельченного сырья этиловым спиртом 70%,

получение извлечения после фильтрования через бумажный фильтр и измерение оптической плотности испытуемого раствора при аналитической волне 280 нм. Концентрацию суммы гидроксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту определяют по формуле

$$X = \frac{A \times m \times 5 \times 100 \times 250 \times 100}{A \times m \times 100 \times 250 \times (100 - W)},$$

где А - оптическая плотность исследуемого раствора, А. - оптическая плотность раствора стандартного образца хлорогеновой кислоты, m - масса навески сырья (г), m. - масса навески стандартного образца хлорогеновой кислоты (г), W - потеря в массе при высушивании (%) [Жукова О.Л., Абрамов А.А., Даргаева Т.Д., Маркарян А.А. Изучение фенольного состава подземных органов сабельника болотного / Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. - 2006 - Т. 47, №5. - С. 342-345.].

Недостатком прототипа является то, что авторы использовали для количественного определения измерение оптической плотности исследуемых растворов при длине волны 280 нм. Однако и другие фенольные соединения, такие как флавоноиды, галловая кислота, танин имеют максимумы поглощения при данной длине волны, что будет приводит к погрешности при определении в анализируемом сырье суммы гидроксикоричных кислот в пересчете на вещества, специфические для побегов боярышника крупноколючкового.

Задачей изобретения является разработка способа количественного определения суммы гидроксикоричных кислот в побегах боярышника крупноколючкового в пересчете на хлорогеновую кислоту, обладающего высокой специфичностью, точностью и воспроизводимостью.

Техническим результатом является повышение точности определения.

Предлагаемый способ количественного определения суммы гидроксикоричных кислот в побегах боярышника крупноколючкового реализуется следующим образом. Аналитическую пробу сырья побегов боярышника крупноколючкового измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 4 мм. Около 0,5 г точной навески измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл 60% этилового спирта. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 60 минут, периодически встряхивая для смывания частиц со стенок. Затем колбу охлаждают в течение 30 мин, потом содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу 100 мл и восполняют недостающий экстрагент 60% этиловым спиртом до метки.

Испытуемый раствор для анализа суммы гидроксикоричных кислот готовят следующим образом: 2 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора до метки 60% этиловым спиртом (испытуемый раствор). У испытуемого раствора измеряют оптическую плотность при длине волны 330 нм. В качестве раствора сравнения используют 60% этиловый спирт.

Содержание суммы гидроксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \times 100 \times 25 \times 100}{m \times 2 \times 507 \times (100 - W)},$$

где:

X - сумма гидроксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту, %;

A - оптическая плотность испытуемого раствора;

m - масса сырья, г;

W - потеря в массе при высушивании, %;

507 - удельный показатель поглощения ( $A_{1\text{см}}^{1\%}$ ) стандартного образца хлорогеновой кислоты при 330 нм [Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV, том IV. ФС.2.5.0019.15, Москва, 2018].

При изучении УФ-спектральных характеристик извлечений из побегов боярышника крупноколочкового выявлено, что именно хлорогеновая кислота определяет характер кривой поглощения водно-спиртового извлечения из побегов боярышника крупноколочкового (фигура).

Изучение УФ-спектров спиртовых извлечений из побегов боярышника крупноколочкового показало максимум собственного поглощения гидроксикоричных кислот 330 нм. Раствор стандартного образца хлорогеновой кислоты так же имеет максимум поглощения при 330 нм. Максимумы поглощения исследуемого извлечения из побегов боярышника крупноколочкового и раствора стандартного образца хлорогеновой кислоты совпадают, что делает целесообразным проведение пересчета суммы гидроксикоричных кислот на хлорогеновую кислоту при использовании метода прямой спектрофотометрии.

Данный факт позволяет также проводить спектрофотометрическое определение суммы гидроксикоричных кислот в побегах боярышника крупноколочкового при длине волны, равной 330 нм.

Нами изучено влияние экстрагента на процесс экстракции (таблица 1). В результате эксперимента в качестве оптимального экстрагента нами был выбран 60% этиловый спирт, так как выход действующих веществ из сырья при его использовании максимален.

Таблица 1

**Выход гидроксикоричных кислот побегов боярышника крупноколочкового в зависимости от концентрации экстрагента**

Концентрация этилового спирта, %	Содержание гидроксикоричных кислот, %
40	2,52±0,32%
50	2,53±0,11%
60	<b>3,16±0,42%</b>
70	2,92±0,51%
95	2,13±0,39%

Далее изучено влияние продолжительности экстракции на кипящей водяной бане, выбрано оптимальное время экстракции 60 минут (таблица 2).

Таблица 2

**Выход гидроксикоричных кислот побегов боярышника крупноколочкового в зависимости от продолжительности экстракции**

Время экстракции на водяной бане, мин.	Содержание гидроксикоричных кислот, %
30	2,70±0,19%
45	2,76±0,33%
60	<b>3,16±0,42%</b>
90	3,06±0,46%

В таблице 3 представлена зависимость выхода гидроксикоричных кислот побегов боярышника крупноколочкового от соотношения «сырье-экстрагент». Максимальный выход действующих веществ наблюдается при соотношении «сырье-экстрагент» 1:200, по этой причине данное соотношение выбрано нами в качестве оптимального.

Таблица 3

**Выход гидроксикоричных кислот побегов боярышника крупноколочкового в зависимости от соотношения «сырье-экстрагент»**

Соотношение «сырье-экстрагент»	Содержание гидроксикоричных кислот, %
1:50	2,54±0,50%
1:100	2,76±0,14%
1:200	<b>3,16±0,42%</b>
1:300	3,03±0,31%

В таблице 4 представлена зависимость выхода гидроксикоричных кислот побегов боярышника крупноколочкового от степени измельчения побегов. Из таблицы 4 видно, что максимальный выход действующих веществ наблюдается при степени измельчения - 4 мм.

Таблица 4

**Выход гидроксикоричных кислот побегов боярышника крупноколочкового в зависимости от степени измельчения сырья**

Степень измельчения сырья, мм	Содержание гидроксикоричных кислот, %
1	2,83±0,31%
2	2,96±0,48%
3	3,09±0,19%
4	<b>3,16±0,42%</b>
5	3,13±0,12%

Учитывая, что увеличение числа операций на стадии пробоподготовки ведет к возрастанию ошибки, нами сделан выбор в пользу одностадийного процесса экстракции с подтверждением требуемой точности количественного определения.

Таким образом, определено, что оптимальными параметрами экстракции являются: однократное извлечение 60% этиловым спиртом на кипящей водяной бане в течение 60 минут в соотношении «сырье экстрагент» - 1:200, оптимальная степень измельчения - 4 мм.

Предлагаемый способ поясняется следующим примером.

Аналитическую пробу сырья побегов боярышника крупноколочкового (заготовлено в Ботаническом саду, г. Уфа 2022 г.) измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 4 мм. 0,5112 г измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл 60% этилового спирта.

Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 60 минут. Затем колбу охлаждают в течение 30 мин, потом содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу 100 мл и восполняют недостающий экстрагент 60% этиловым спиртом до метки.

Испытуемый раствор для анализа суммы гидроксикоричных кислот готовят следующим образом: 2 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 60% (испытуемый раствор). У испытуемого раствора измеряют оптическую плотность при длине волны 330 нм. В качестве раствора сравнения используют 60% этиловый спирт.

Содержание суммы гидроксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту и абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

$$X = \frac{0,5821 \times 100 \times 25 \times 100}{0,5112 \times 2 \times 507 \times (100 - 9,1)}$$

где:

X - сумма гидроксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту, %

0,5821 - оптическая плотность испытуемого раствора;

507 - удельный показатель поглощения хлорогеновой кислоты при 330 нм;

0,5112 - масса сырья, г;

9,1 - потеря в массе при высушивании, %.

X=3,09%.

Содержание суммы гидроксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту равно 3,09%.

Все результаты были статистически обработаны. Ошибка единичного количественного определения составила  $\pm 0,42\%$ .

Таким образом, предлагаемый способ количественного определения суммы гидроксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту в побегах боярышника крупноколючкового с использованием прямой спектрофотометрии разработан впервые для данного вида сырья и обладает следующими преимуществами:

1. Разработанный метод является специфичным и селективным, а также позволяет проводить экстракцию сырья однократно 60% этиловым спиртом, позволяющим исчерпывающе извлекать гидроксикоричные кислоты.

2. Пересчет суммы гидроксикоричных кислот идет на специфическое соединение для побегов боярышника крупноколючкового - хлорогеновую кислоту, определяющее характер кривой поглощения в УФ - спектре испытуемого раствора (длина волны 330 нм).

3. Ошибка единичного определения предлагаемого способа составляет  $\pm 0,42\%$ , что свидетельствует об объективности разработанного способа.

Предлагаемый способ можно применять в центрах контроля качества лекарственных средств, на фармацевтических предприятиях и контрольно-аналитических лабораториях при проведении количественного анализа в побегах боярышника крупноколючкового (*Crataegus macracantha*).

#### (57) Формула изобретения

Способ количественного определения суммы гидроксикоричных кислот в побегах боярышника крупноколючкового, включающий экстракцию измельченного сырья этиловым спиртом, получение водно-спиртового извлечения, измерение оптической плотности испытуемого раствора, вычисление суммы гидроксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту по формуле с учетом оптической плотности, массы сырья и потери в массе при высушивании, отличающийся тем, что побеги боярышника крупноколючкового измельчают до частиц 4 мм, экстракцию проводят 60% этиловым спиртом, в соотношении «сырье-экстрагент» - 1:200, оптическую плотность раствора

измеряют при длине волны 330 нм, а содержание суммы гидроксикоричных кислот в побегах боярышника крупноколючкового в пересчете на хлорогеновую кислоту вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \times 100 \times 25 \times 100}{m \times 2 \times 507 \times (100 - W)};$$

где:

X - сумма гидроксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту, %;

A - оптическая плотность испытуемого раствора;

m - масса сырья, г;

W - потеря в массе при высушивании, %;

507 - удельный показатель  $A_{1\text{см}}^{1\%}$  поглощения ( ) государственного стандартного образца хлорогеновой кислоты при 330 нм.

15

20

25

30

35

40

45

