

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391010** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2024.10.31

(22) Дата подачи заявки
2023.04.27

(51) Int. Cl. *A61K 36/185* (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01)
C12M 1/02 (2006.01)
C12M 1/36 (2006.01)
C12M 1/38 (2006.01)
A61K 127/00 (2006.01)

(54) **СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ КАРОТИНОИДОВ В
МОРИНГИ МАСЛИЧНОЙ ЛИСТЬЯХ**

(96) **2023000073 (RU) 2023.04.27**
(71) Заявитель:
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ "ПЕНЗЕНСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ" (ФГБОУ ВО
"ПГУ") (RU)**

(72) Изобретатель:
**Курдюков Евгений Евгеньевич,
Моисеева Инесса Яковлевна,
Митишев Александр Владимирович,
Родина Олеся Петровна, Водопьянова
Ольга Александровна (RU)**

(57) Изобретение относится к пищевой, химико-фармацевтической и косметической отраслям промышленности и может быть использовано при проведении стандартизации сырья моринги масличной и фармацевтических субстанции на его основе, а также для проведения НИР в ВУЗах. Способ идентификации и количественного определения заключается в том, что извлекают каротиноиды из моринги листьев гексаном и рассчитывают количественное содержание каротиноидов по оптической плотности в экстракте при 450 ± 2 нм (максимум) в пересчете на β -каротин, и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по определенной формуле. Вышеописанный способ количественного определения суммы каротиноидов в листьях моринги масличной является простым, доступным, специфичным и точным.

A1

202391010

202391010

A1

СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ КАРОТИНОИДОВ В МОРИНГИ МАСЛИЧНОЙ ЛИСТЬЯХ

Изобретение относится к пищевой, химико-фармацевтической и косметической отраслям промышленности и может быть использовано при проведении стандартизации сырья моринги масличной и фармацевтических субстанции на его основе, а также для проведения НИР в ВУЗах.

Действующая система контроля качества лекарственных препаратов требует постоянного совершенствования 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 (1).

Моринга масличная (*Moringa oleifera* Lam.) является малоизученным растением. В настоящее время сырье моринги масличной используется в пищевой и фармацевтической (при производстве БАДов) промышленности, но не является лекарственным растительным сырьем. Листья моринги являются перспективным лекарственным растительным источником получения биологически активных соединений для получения фармацевтических субстанции, обладающих широким спектром фармакологической активности, включая, противовоспалительный, антибактериальный, антиоксидантный эффект (1,2).

Моринги масличной листья содержит комплекс биологически активных соединений: каротиноиды, флавоноиды, фенилпропаноиды, сапонины (2). На наш взгляд, с точки зрения химической стандартизации наибольший интерес представляет β -каротин. Контроль над суммарным содержанием каротиноидов принято осуществлять с помощью спектрофотометрии (3-6), так как данные соединения имеют электронные спектры поглощения с максимумами при 422-428, 444-450, 472-484 нм.

Известен способ количественного определения суммы каротиноидов в экстрактах семян растений методом прямой спектрофотометрии. Данная методика включает использование петролейного эфира и тетрагидрофурана, капроновую мембрану (7).

Недостатком данного способа является длительность и трудоемкость методики, а также использование веществ из списка прекурсоров (список IV).

Наиболее близким к заявленному способу является способ количественного определения каротиноидов спектрофотометрическим методом (8), взятый за прототип. Данная методика включает в себя трехкратную экстракцию измельченного сырья, использование делительной воронки и тонкослойной хроматографии.

Как видно из описания, этот способ многостадийный, трудоемкий. В связи с этим целью изобретения является разработка способа определения суммы каротиноидов сырья моринги масличной.

Техническим результатом является создание способа количественного определения суммы каротиноидов в моринги масличной листьях в пересчете на β -каротин. Технический результат достигается тем, что полученное извлечение фильтровали через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А). Затем в мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 1,0 мл полученного фильтрата и доводили объем экстрагентом до метки (раствор Б). Перед экстракцией извлечение из сырья моринги проходило предварительную обработку на магнитной мешалке с подогревом, при температуре 60 °С и скорости вращения 100 об/минуту в течение 5 минут, затем проводится экстракция из сырья, осуществляют однократно, в течение 90 мин, соотношение сырье экстрагент 1:8, в качестве экстрагента используют гексан:ацетон в соотношении 1:2 (добавляли 25 мл экстрагента из них 8,33 мл гексана и 16,67 мл ацетона). Оптическую плотность раствора Б измеряли на спектрофотометре при длине волны 450±2 нм. Параллельно относительно воды очищенной измеряли оптическую плотность раствора СО калия бихромата (0,04%). В качестве раствора сравнения использовали воду очищенную. Содержание суммы каротиноидов в сырье дерезы китайской (X) в пересчете на β -каротин в мг% рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{D_1 \times 0,00208 \times 25 \times 25 \times 100 \times 100}{D_0 \times m \times 1 \times (100 - W)}$$

где D1 –оптическая плотность испытуемого раствора;

D0–оптическая плотность раствора СО калия бихромата;

0,00208 –количество β -каротина, мг, в растворе, соответствующем по окраске раствору СО калия бихромата;

m –навеска сырья, г;

w – влажность сырья, %

При изучении спектральных характеристик было выявлено, что именно β -каротин определяет характер кривой поглощения гексан-ацетонового извлечения из моринги масличной листьев (фиг.).

Изучение УФ-спектров экстрактов моринги масличной (фиг.) показало, что максимум собственного поглощения каротиноидов гексан-ацетоновых экстрактов из моринги масличной листьев наблюдался при 450±2 нм. Раствор СО β -каротина имеет максимум поглощения при 450±2 нм. Ввиду близкого расположения максимумов поглощения исследуемого извлечения из моринги масличной листьев и вещества-стандарта β -каротин, одним из целесообразных вариантов стандартизации является прямая

спектрофотометрия.

Данный факт позволяет проводить спектрофотометрическое определение суммы каротиноидов в моринги масличной листьях при аналитической длине волны 450 ± 2 нм. Также нами было изучено влияние экстрагента на процесс экстракции. В таблице 1 представлена зависимость выхода каротиноидов из моринги масличной листьев от природы экстрагента. При этом гексан:ацетон был выбран в качестве оптимального экстрагента. Предварительная обработка на магнитной мешалке с подогревом используется для увеличения выхода биологически активных соединений из сырья.

Таблица 1.

С целью разработки методики количественного определения суммы каротиноидов определены оптимальные условия экстракции каротиноидов: экстрагент – гексан:ацетон в соотношении 1:2; соотношение «сырье – экстрагент» - 1:8; время экстракции – в течение 90 минут; степень измельченности сырья – 0,5 мм (табл.2).

Экстрагент	Соотношение «сырье – экстрагент»	Степень измельченности, мм	Время экстракции, мин	Содержание суммы каротиноидов в пересчете на β -каротин, мг%
Влияние экстрагента				
гексан	1:8	1,0	90	22,85 \pm 0,53
ацетон	1:8	1,0	90	56,92 \pm 0,88
гексан + ацетон (1:2)	1:8	1,0	90	66,62 \pm 0,82
Спирт 95%	1:8	1,0	90	33,54 \pm 0,87
Влияние соотношения «сырье – экстрагент»				
гексан + ацетон (1:2)	1:5	1,0	90	63,21 \pm 0,92
гексан + ацетон (1:2)	1:8	1,0	90	66,12 \pm 0,68
гексан + ацетон (1:2)	1:12	1,0	90	62,35 \pm 1,01
гексан + ацетон (1:2)	1:25	1,0	90	57,34 \pm 0,84
Влияние степени измельченности				
гексан + ацетон (1:2)	1:8	0,2	90	60,12 \pm 1,05
гексан + ацетон (1:2)	1:8	0,5	90	66,85 \pm 0,99
гексан + ацетон (1:2)	1:8	1,0	90	65,91 \pm 0,88
гексан + ацетон (1:2)	1:8	2,0	90	60,92 \pm 0,84
Влияние времени экстрагирования				
гексан + ацетон (1:2)	1:8	0,5	30	52,20 \pm 0,93
гексан + ацетон (1:2)	1:8	0,5	60	65,68 \pm 0,75
гексан + ацетон (1:2)	1:8	0,5	90	66,96 \pm 0,87
гексан + ацетон (1:2)	1:8	0,5	120	64,29 \pm 0,86

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

Таким образом, было определено, что оптимальными параметрами экстракции являются: однократное извлечение гексан + ацетон в соотношении 1:2 в течение 90 минут в соотношении «сырье-экстрагент» - 1:8 при комнатной температуре.

Принимая во внимание тот факт, что специфическим для моринги масличной листьев является β -каротин, а максимумы поглощения раствора β -каротина и экстрактов моринги масличной листьев находятся в области – 450 ± 2 нм (максимум), целесообразным является определение содержания суммы каротиноидов в пересчете на β -каротин при длине волны 450 ± 2 нм.

Способ реализуется следующим образом.

Аналитическую пробу моринги масличной листьев измельчают до размера частиц 0,5 мм. Около 3 г (точная навеска) измельченного сырья помещали в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, приливали 25 мл экстрагента гексан+ацетон в соотношении 1:2, проводили предварительную обработку на магнитной мешалке с подогревом при температуре 60 °С и скорости вращения 100 об/минуту в течение 5 минут, затем проводили экстрагирование в течение 90 минут при комнатной температуре. Полученное извлечение фильтровали через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А). Затем в мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 1,0 мл полученного фильтрата и доводили объем экстрагентом до метки (раствор Б). Оптическую плотность раствора Б измеряли на спектрофотометре при длине волны 450 ± 2 нм. Параллельно относительно воды очищенной измеряли оптическую плотность раствора СО калия бихромата (0,04%). В качестве раствора сравнения использовали воду очищенную.

Содержание суммы каротиноидов в сырье моринги масличной (X) в пересчете на β - каротин в мг% рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{D_1 \times 0,00208 \times 25 \times 25 \times 100 \times 100}{D_0 \times m \times 1 \times (100 - W)}$$

где D1 –оптическая плотность испытуемого раствора;

D0–оптическая плотность раствора СО калия бихромата;

0,00208 –количество β-каротина, мг, в растворе, соответствующем по окраске раствору СО калия бихромата;

m –навеска сырья, г;

w – влажность сырья, %

Предлагаемый способ поясняется следующим примером.

Аналитическую пробу сырья моринги масличной измельчают до размера частиц 0,5 мм. Около 3 г (точная навеска) измельченного сырья помещали в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, приливали 25 мл экстрагента гексан+ацетон в соотношении 1:2, проводили предварительную обработку на магнитной мешалке с подогревом при температуре 60 °С и скорости вращения 100 об/минуту в течение 5 минут, затем проводили экстрагирование в течение 90 минут при комнатной температуре. После полученные извлечения фильтровали через бумажный фильтр (красная полоса), отбирали первые 10 мл фильтрата (раствор А).

Испытуемый раствор для анализа суммы каротиноидов готовят следующим образом: 1,0 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора до метки гексан+ацетон в соотношении 1:2 (испытуемый раствор). Параллельно относительно воды очищенной измеряли оптическую плотность раствора СО калия бихромата (0,04%). В качестве раствора сравнения использовали воду очищенную.

После измерения оптической плотности извлечения из моринги масличной листьев при длине волны 450±2 нм, содержание суммы каротиноидов в сырье моринги масличной (X) в пересчете на β-каротин в мг% рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{0,9991 \times 0,00208 \times 25 \times 25 \times 100 \times 100}{0,7103 \times 3,001 \times 1 \times (100 - 9)}$$

где 0,9991 –оптическая плотность испытуемого раствора;

0,7103–оптическая плотность раствора СО калия бихромата;

0,00208 –количество β-каротина, мг, в растворе, соответствующем по окраске раствору СО калия бихромата;

3,001 –навеска сырья, г;

9 – влажность сырья, %

Содержание суммы каротиноидов, в пересчете на β – каротин, составило 66,96 мг%.

Все результаты были статистически обработаны. Ошибка единичного количественного определения составила ±1,31%.

Предлагаемый способ количественного определения суммы каротиноидов в пересчете на β-каротин в моринги масличной листьях с использованием прямой спектрофотометрии разработан впервые для данного вида сырья и обладает следующими преимуществами:

1. Разработанный метод является более специфичным и селективным, а также позволяет проводить экстракцию сырья однократно гексан+ацетоном в соотношении 1:2, позволяющий исчерпывающе извлекать целевые вещества (каротиноиды).

2. Ошибка единичного определения предлагаемого способа составляет ±1,31%, что свидетельствует об объективности разработанного способа и высокой точности.

Этот способ можно применять в центрах контроля качества лекарственных средств, на фармацевтических предприятиях и контрольно-аналитических лабораториях при проведении количественного анализа моринги масличной листьев (*Moringa oleifera*).

ИСТОЧНИКИ ИНФОРМАЦИИ

1. Foidl, N.; Makkar, H.P.S.; Becker, K. The potential of *Moringa oleifera* for agricultural and industrial uses. In *The Miracle Tree: The Multiple Attributes of Moringa*; Fuglie, L.J., Ed.; Church World Service: Dakar, Senegal. 2001. pp. 45–76.

2. Ndhala, A.R., Mulaudzi, R., Ncube, B., Abdelgadir, H.A., du Plooy, C.P., and Van Staden, J. Antioxidant, antimicrobial and phytochemical variations in thirteen *Moringa oleifera* Lam. cultivars. *Molecules*. 2014. V.19. N.7. pp. 10480–10494. PubMed <http://dx.doi.org/10.3390/molecules190710480>

3. Первушкин С.В., Куркин В.А., Воронин А.В. и др. Методики идентификации различных пигментов и количественного спектрофотометрического определения суммарного содержания каротиноидов и белка в фитомассе *S.platensis* (Nords.) Geilt. // Растительные ресурсы. 2002. № 1. С. 112–119.

4. Писарев Д.И., Новиков О.О., Романова Т.А. Разработка экспресс-метода определения каротиноидов в сырье растительного происхождения // Научные ведомости БелГУ. 2010. № 22. С. 119–122.

5. Рыбакова О.В., Сафонова Е.Ф., Сливкин А.И., Оголь Г.А. Определение суммы каротиноидов в растительных маслах и масляных экстрактах // Тезисы доклада 3-ей Всероссийской Научно-методической конференции «Фармообразование-2007», Часть первая. Воронеж, 2007. С. 306 – 308.

6. Ульяновский Н.В., Косяков Д.С., Боголицын К.Г. Разработка экспрессных методов аналитической экстракции каротиноидов из растительного сырья // Химия растительного сырья. 2012. № 4. С. 147–152.

7. Булда О.В., Рассадина В.В., Алексейчук Г.Н., Ламан Н.А. Спектрофотометрический метод определения содержания каротинов, ксантофиллов и хлорофиллов в экстрактах семян растений // Физиология растений. 2008. Т.55. №.4. С.604-611

8. RAMESH KUMAR SAINI et all. Carotenoid content in vegetative and reproductive parts of commercially grown *Moringa oleifera* Lam. cultivars from India by LC-APCI-MS //Eur Food Res Technol, 15.12.2014, DOI 10.1007/s00217-014-2174-3.

Формула изобретения

Способ количественного определения суммы каротиноидов в моринги масличной листьях, с предварительным получением гексан+ацетонового 1:2 извлечения из моринги масличной листьев путем экстракции 3 г точной навески, измельченной до частиц 0,5 мм сырья моринги масличной гексан+ацетоном 1:2, в пересчете на β - каротин, методом прямой спектрофотометрии, с предварительной обработкой на магнитной мешалке с подогревом при температуре 60 °С и скорости вращения 100 об/минуту в течение 5 минут,

испытуемый раствор для анализа суммы каротиноидов готовят следующим образом: 1,0 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора до метки гексан+ацетон в соотношении 1:2 (испытуемый раствор), параллельно относительно воды очищенной измеряли оптическую плотность раствора СО калия бихромата (0,04%), в качестве раствора сравнения использовали воду очищенную,

отличающийся тем, что проводится предварительная обработка на магнитной мешалке с подогревом при температуре 60 °С и скорости вращения 100 об/минуту в течение 5 минут, экстракцию сырья осуществляют однократно, в течение 90 мин, в качестве экстрагента используют гексан+ацетон в соотношении 1:2, соотношение сырье экстрагент 1:8, количественное определение суммы каротиноидов в моринги масличной листьях проводят при длине волны 450 ± 2 нм в пересчете на β -каротин и содержание суммы каротиноидов в моринги масличной листьях (X) в пересчете на β -каротин в мг% рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{D_1 \times 0,00208 \times 25 \times 25 \times 100 \times 100}{D_0 \times m \times 1 \times (100 - W)}$$

где D_1 –оптическая плотность испытуемого раствора;

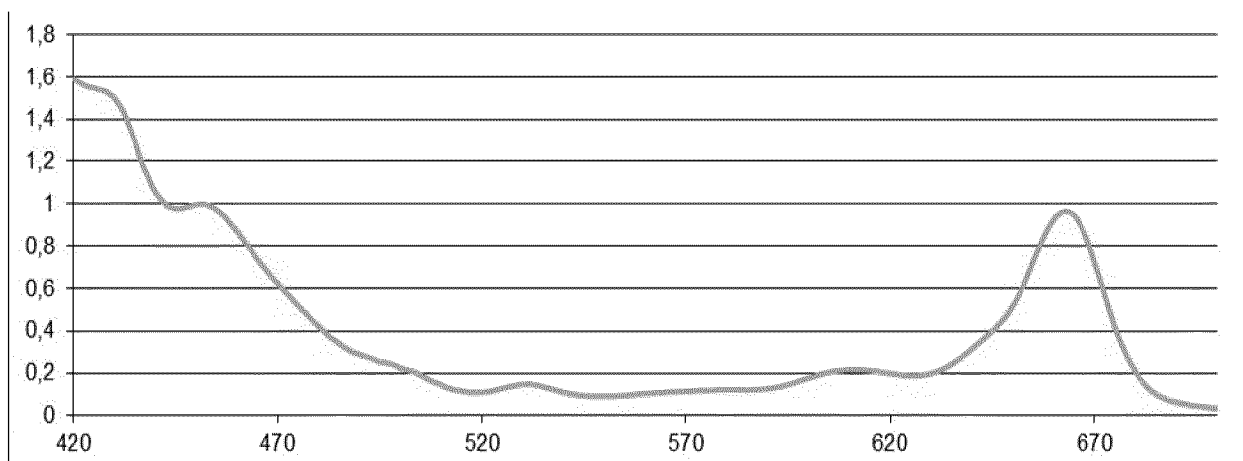
D_0 –оптическая плотность раствора СО калия бихромата;

0,00208 –количество β -каротина, мг, в растворе, соответствующем по окраске раствору СО калия бихромата;

m –навеска сырья, г;

w – влажность сырья, %

СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ КАРОТИНОИДОВ В МОРИНГИ
МАСЛИЧНОЙ ЛИСТЬЯХ



Фиг.

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202391010

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:
См. дополнительный лист

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)
C12M 1/02, 1/34, 1/36, 1/38, A61K 36/185, 127/00, G01N 33/15, 33/52

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, используемые поисковые термины)
Espacenet, EAPATIS, Google, Reaxys

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	КУТИХИНА Е.А. и др. Методика количественного определения пигментов в листьях моринги. Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Естественные науки, 2021, N 1, страницы 16-20	1
Y	КУРДЮКОВ Е.Е. и др. Количественное определение суммы каротиноидов в плодах дерезы китайской <i>Lucium Chinense</i> Mill. ХИМИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ, 2020, N3, С. 139–144, таблица 2 "Экстрагент", 3-я строка DOI: 10.14258/jcprtm.2020036609	1
Y	RU 2763265 С1 (ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ "ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ) 28.12.2021, страницы 5-8, таблица 1, формула	1
Y	МИЛЕВСКАЯ В. В. Определение биологически активных веществ лекарственном растительном сырье антидепрессантного и противовоспалительного действия. Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук. Краснодар, 2017, страница 57, абзац 3, страница 63, абзац 2	1
Y	RU 2781142 С2 (КАО КОРПОРЕЙШНБ) 06.10.2022, параграф [0153], абзац 3	1

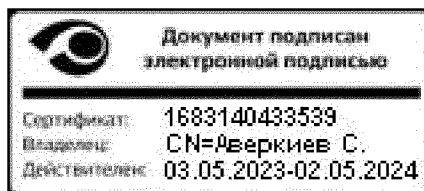
последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:
«А» - документ, определяющий общий уровень техники
«D» - документ, приведенный в евразийской заявке
«Е» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее
«О» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.
"Р" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения
«Х» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности
«У» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории
«&» - документ, являющийся патентом-аналогом
«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 02 ноября 2023 (02.11.2023)

Уполномоченное лицо:
Начальник Управления экспертизы



С.Е. Аверкиев

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(дополнительный лист)

Номер евразийской заявки:

202391010

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (продолжение графы А)

МПК:

A61K 36/185 (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01)
C12M 1/02 (2006.01)
C12M 1/36 (2006.01)
C12M 1/38 (2006.01)
A61K 127/00 (2006.01)

СПК:

A61K 36/185
G01N 33/15
C12M 1/02
C12M 1/36
C12M 1/38