



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **80597** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
G01N 33/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2012 12473	(72) Винахідник(и): Ходаков Ігор Володимирович (UA), Левицький Анатолій Павлович (UA), Макаренко Ольга Анатоліївна (UA)
(22) Дата подання заявки: 31.10.2012	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.06.2013	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ СТОМАТОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ", вул. Рішельєвська, 11, м. Одеса, 65026 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.06.2013, Бюл.№ 11	

(54) СПОСІБ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ПОЛІФЕНОЛІВ В РОСЛИННИХ ЕКСТРАКТАХ

(57) Реферат:

Спосіб ідентифікації поліфенолів в рослинних екстрактах полягає у знятті хроматограм і порівнянні ідентифікаційних характеристик досліджуваних речовин з ідентифікаційними характеристиками стандарту. Хроматографічний аналіз - зняття хроматограм стандартів та досліджуваних речовин - проводять в ультрафіолетовому діапазоні на чотирьох довжинах хвиль: 225, 255, 286 і 350 нм, на хроматограмі вимірюють час утримування T , вимірюють висоту H одного й того ж піка на хроматограмах при чотирьох довжинах хвиль: 225, 255, 286 і 350 нм, отримують значення H_{225} , H_{255} , H_{286} , H_{350} , і за допомогою комп'ютерного обладнання за розробленим алгоритмом визначають: спектральні характеристики речовини - відносні значення висот піків h_{255} - при 255 нм, h_{286} - при 286 нм, h_{350} - при 350 нм шляхом ділення цих значень висот піка на висоту піка при 225 нм.

UA 80597 U

Корисна модель належить до аналітичної біохімії і стосується ідентифікації речовин в рослинних екстрактах складної композиції з використанням високоефективної рідинної хроматографії.

Основним загальноприйнятим методом є ідентифікація речовин по абсорбційним пікам на хроматограмах шляхом порівняння часу утримування цих речовин в хроматографічній колонці з аналогічним показником для чистих речовин (стандартів), час утримування яких визначено заздалегідь. При збігу або прийнятному відхиленні часу утримування досліджуваної речовини від стандарту цю речовину ідентифікують як аналогічну даному стандарту (Murphy P.A. Separation of genistin, daidzin and their aglycons, and coumestrol by gradient high-performance liquid chromatography/J.Chromatogr., 1980, 211, 166-169). Даний метод не дозволяє однозначно визначати речовини при аналізі складних рослинних екстрактів, тому що висока ймовірність наявності в пробах речовин, відмінних за будовою від стандарту, що мають подібне зі стандартом час утримування. Для підвищення точності ідентифікації додатково проводять спектральне сканування рухомої фази (елюенту) на виході з колонки через певні часові інтервали або в момент формування максимуму піків для подальшого порівняння спектра поглинання досліджуваних речовин зі спектром розчинів стандартів, попередньо отриманих із застосуванням спектрофотометрів. На основі схожості спектрів роблять висновок про відповідність досліджуваної речовини стандарту (Семинистая Е.Н., Ларионов О.Г. Изучение состава и антиоксидантной активности растительных экстрактов методом ВЭЖХ с УФ- и амперометрическим детектированием // Химико-фармац. журн., 2008, 42, 9, 43-48.; Wang L.-H., Li W.-H. General method for determining of flavonoids in medicinal plants and raw cosmetics using HPLC with a photodiode array detector // Химико-фармац. журн., 2007, 41, 4, 46-51). Незважаючи на інформативність, дані методи мають такі недоліки:

- потрібне спеціальне додаткове оснащення рідинних хроматографів;
- точність сканування спектрів поглинання залежить від швидкості руху елюенту;
- час утримування речовин в складних сумішах може відрізнятися від аналогічного показника їх чистих аналогів, що заважає вибрати оптимальний період для спектрографування;
- для порівняння схожості спектрограм необхідна складна математична обробка або спеціальне програмне забезпечення.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалення способу ідентифікації речовин по абсорбційним пікам на хроматограмах шляхом зняття хроматограм на визначених довжинах хвиль, за рахунок чого створюються умови для визначення спектральних характеристик речовин, що дозволить підвищити точність ідентифікації речовин в рослинних екстрактах складної композиції, а також знаходити речовини з різним часом виходу, які мають схожі спектральні характеристики, навіть якщо немає стандартів цих речовин.

Ідентифікацію речовин проводять шляхом порівняння спектральних характеристик стандарту та досліджуваних речовин, час утримування яких збігається або відрізняється не більше ніж на 0,5 хвилин.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі ідентифікації поліфенолів в рослинних екстрактах, що полягає у знятті хроматограм і порівнянні ідентифікаційних характеристик досліджуваних речовин з ідентифікаційними характеристиками стандарту, відповідно до корисної моделі, (хроматографічний аналіз) зняття хроматограм стандартів та досліджуваних речовин проводять в ультрафіолетовому діапазоні на чотирьох довжинах хвиль: 225, 255, 286 і 350 нм, на хроматограмі вимірюють час утримування T , вимірюють висоту H одного й того ж піка на хроматограмах при чотирьох довжинах хвиль: 225, 255, 286 і 350 нм, отримують значення H_{225} , H_{255} , H_{286} , H_{350} , і за допомогою комп'ютерного обладнання за розробленим алгоритмом визначають: спектральні характеристики речовини - відносні значення висот піків h_{255} - при 255 нм, h_{286} - при 286 нм, h_{350} - при 350 нм шляхом ділення цих значень висот піка на висоту піка при 225 нм, і індекси схожості ідентифікаційних характеристик досліджуваної речовини і стандарту: I_T - індекс схожості часу утримування досліджуваної речовини і стандарту при $d=0,5$, I_{255} - індекс схожості спектральної характеристики досліджуваної речовини і стандарту на довжині хвилі 255 нм, I_{286} - індекс схожості спектральної характеристики досліджуваної речовини і стандарту на довжині хвилі 286 нм, I_{350} - індекс схожості спектральної характеристики досліджуваної речовини і стандарту на довжині хвилі 350 нм при значеннях d : 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3 по формулах:

$$I_T = 1 - \frac{|T_{st} - T_u|}{d},$$

$$I_{255} = 1 - \frac{|h_{255_{st}} - h_{255_u}|}{d},$$

$$I_{286} = 1 - \frac{|h_{286_{st}} - h_{286_u}|}{d},$$

$$I_{350} = 1 - \frac{|h_{350_{st}} - h_{350_u}|}{d},$$

5 де T_{st} , $h_{255_{st}}$, $h_{286_{st}}$, $h_{350_{st}}$ - ідентифікаційні характеристики стандарту, T_u , h_{255_u} , h_{286_u} , h_{350_u} - аналогічні характеристики досліджуваної речовини, d - діапазон, в межах якого характеристики, що зрівнюються, вважаються схожими, і, якщо індекси схожості для всіх характеристик більше 0 (при d не більшим 0,30 для спектральних характеристик і при d не більшим 0,5 для часу утримання), речовина вважається ідентичною стандарту.

10 Мінімальна величина d , при якій всі індекси схожості більше нуля, є оцінкою точності ідентифікації речовини. Точність ідентифікації розраховують по формулі:

$$p = (1 - d_{min}) \cdot 100\%,$$

де d_{min} - мінімальна величина d , при якій всі індекси схожості більше нуля.

15 Застосування способу дозволяє також знаходити речовини з різним часом виходу, які мають схожі спектральні характеристики, навіть якщо немає стандартів цих речовин, наприклад, аглікони рослинних поліфенолів та їх глікозидні форми, а також виявляти окремі групи поліфенолів без ідентифікації окремих речовин.

20 Сканування при вказаних довжинах хвиль дозволяє ідентифікувати поліфеноли, що належать до наступних класів біофлавоноїдів: флаволи, флавоноли, флаванони, катехіни, ізофлаволи.

Спосіб не залежить від типу хроматографа й колонки та умов хроматографування, не вимагає попереднього детального спектрографування чистих речовин, не вимагає додаткового оснащення хроматографа. Спосіб враховує можливе відхилення часу утримання речовин від стандартного, що викликається спільним впливом речовин одна на одну в складній суміші.

25 Опис корисної моделі

Спосіб ідентифікації речовин здійснюється наступним чином. Вимірюють висоту одного й того ж піка на хроматограмах при чотирьох довжинах хвиль: 225, 255, 286 і 350 нм. Розраховують відносну висоту піка при 255, 286 і 350 нм шляхом ділення значень висот піка при цих довжинах хвиль на висоту при 225 нм. Отримують три величини, які і є спектральними характеристиками речовини. Разом з часом утримання ці характеристики становлять ідентифікаційні характеристики речовин. Ідентифікацію речовин проводять шляхом порівняння їх ідентифікаційних характеристик із стандартними при заданому допустимому відхиленні з використанням індексу схожості:

$$I_i = 1 - \frac{|a_{st} - a_u|}{d},$$

35 де a_{st} - характеристика стандарту, a_u - аналогічна характеристика досліджуваного речовини, d - гранично допустиме відхилення характеристик. Індекс схожості приймає значення від $-\infty$ до 1. Речовина вважається ідентичною стандарту, якщо індекси схожості для всіх характеристик більше 0 при d не більше ніж 0,30 для спектральних характеристик та при $d=0,5$ для часу утримання. Чим менше d , при якому виявляється схожість, тим вище точність ідентифікації.

40 Спосіб дозволяє ідентифікувати поліфеноли, що належать до наступних класів біофлавоноїдів: флаволи, флавоноли, флаванони, катехіни, ізофлаволи. Спосіб не залежить від типу хроматографа й колонки та умов хроматографування, не вимагає попереднього детального спектрографування чистих речовин, не вимагає додаткового оснащення хроматографа. Спосіб враховує можливе відхилення часу утримання речовин від стандартного, викликаного спільним впливом речовин один на одного в складній суміші, на основі додаткової спектральної характеристики дозволяє точніше ідентифікувати речовини в пробах складної композиції, не вимагає складних математичних обчислень.

50 В інституті стоматології НАМН Україна (Одеса) було проведено випробування ефективності запропонованого способу при аналізі спиртового екстракту препарату ЕКСО (екстракт насіння сої) виробництва НПА "Одеська біотехнологія" з метою визначення ізофлавону геністеїну і його

похідних (глікозидних) форм шляхом порівняння ідентифікаційних характеристик досліджуваних речовин з характеристиками стандарту геністеїна. Для перевірки правильності визначення додатково використовували стандарт його глікозиду - геністину.

Аналіз проводили на хроматографічній системі Shimadzu (Японія): дегазатор DGU-20A3, насосна система LC-20AD, автосемплер SIL-20AC, детекторний блок SPD-20AV, колонковий блок CTO-20A, обернено-фазова колонка Micosorb-MV C18 (довжина 150 мм, діаметр 4,6 мм, зерно сорбенту 5 мкм).

Рухома фаза (елюент) - система метанол і 0,9 %-ий розчин фосфорної кислоти в деіонізованій воді. Режим хроматографування - градієнтний. Початкове співвідношення компонентів елюенту: 1:9. Склад елюенту в ході аналізу змінювався за наступною схемою (по метанолу):

- перші 13 хвилин - підвищення з 10 до 40 %;
- з тринадцятої до 20-ої хвилини - підвищення від 40 до 53 %;
- з 20-ї до 26-ої хвилини - підвищення з 53 до 55 %;
- з 26-ої до 40-ої хвилини - утримування 55 %;
- з 40-ої до 41-ої хвилини - зниження до 10 %;
- з 41-ої до 56-ої хвилини - утримування 10 %.

Швидкість руху елюенту - 0,5 мл/хв, температура колонки - 40 °С, об'єм проби що вводиться - 5 мкл.

Керування хроматографом та аналіз хроматограм проводили за допомогою програмного забезпечення LCsolution v.1.21 SP1 (Shimadzu Corporation).

Розчин для аналізу приготували шляхом настоювання 100 мг сухої речовини препарату ЕКСО в 10 мл метанолу протягом доби з наступною фільтрацією.

У таблиці представлені ідентифікаційні характеристики основних піків на хроматограмі, де T - час утримування (хв), h_{255} , h_{286} , h_{350} - відносні спектральні характеристики, а також індекси схожості часу утримування речовин з часом утримування стандарту геністеїну (I_T), інтервал d , в межах якого виявлено схожість за спектральними характеристиками. Ідентифікаційні характеристики стандарту геністеїну наведені в першому рядку, геністину - у другому.

В результаті аналізу з високою точністю ($d=0,05-0,10$; $r=95-90\%$) було виявлено чотири форми геністеїну (піки 4, 8, 10, 11). З них пік 11 за всіма характеристиками відповідав стандарту геністеїну. Використання стандарту глікозиду геністеїну - геністину - підтвердило правильність визначення однієї з форм - пік 4 відповідав саме геністину. Не дивлячись на те, що в даній роботі не використовували стандарти речовин 8 і 10, аналіз подібних хроматограм з інших літературних джерел дозволив ідентифікувати пік 8 як малоніл-геністин, а пік 10 як ацетил-геністин (Chwankhayan Ph. et al. Hydrolysis of soybean isoflavonoid glycosides by Dalberia β -glucosidases./J.Agric.Food Chem., 2007, 55, 2407-2412; Lin P.-Y., Lai H.-M. Bioactive compounds in Legumes and their germinated products/J.Agric.Food Chem., 2006, 54, 3807-3814).

На рисунку представлена хроматограма розчину препарату ЕКСО при 255 нм, де 4 - геністин, 8 - малоніл-геністин, 10 - ацетил-геністин, 11 - геністеїн. Номери піків відповідають номерам речовин в таблиці. Чорним кольором виділено пік геністеїну, сірим - піки його похідних форм.

Таблиця

Ідентифікація речовин розчину препарату ЕКСО за схожістю з геністеїном

Номер піка	T	h_{255}	h_{286}	h_{350}	I_T	d	Ідентифікація
Стандарт геністеїну	24,907	2,275	0,827	0,177	-	-	
Стандарт геністину	17,869	2,341	0,744	0,173	-	-	
1	15,742	1,521	0,599	0	<0	>0,5	
2	16,553	1,295	0,496	0,110	<0	>0,5	
3	17,475	0,792	0,631	0,351	<0	>0,5	
4	17,852	2,311	0,746	0,180	<0	0,10	форма геністеїну (геністин)
5	19,397	1,258	0,615	0,140	<0	>0,5	
6	20,460	2,893	0,921	0,164	<0	>0,5	

Продовження таблиці

Номер піка	T	h_{255}	h_{286}	h_{350}	I_T	d	Идентифікація
7	20,858	1,631	0,617	0,016	<0	>0,5	
8	21,282	2,362	0,751	0,181	<0	0,10	форма геністеїну (малоніл- геністин)
9	22,353	1,543	0,633	0,020	<0	>0,5	
10	23,262	2,278	0,738	0,168	<0	0,05	форма геністеїну (ацетіл- геністин)
11	24,770	2,284	0,837	0,188	>0	0,05	геністеїн

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

5

Спосіб ідентифікації поліфенолів в рослинних екстрактах, що полягає у знятті хроматограм і порівнянні ідентифікаційних характеристик досліджуваних речовин з ідентифікаційними характеристиками стандарту, який **відрізняється** тим, що (хроматографічний аналіз) зняття хроматограм стандартів та досліджуваних речовин проводять в ультрафіолетовому діапазоні на чотирьох довжинах хвиль: 225, 255, 286 і 350 нм, на хроматограмі вимірюють час утримування T, вимірюють висоту H одного й того ж піка на хроматограмах при чотирьох довжинах хвиль: 225, 255, 286 і 350 нм, отримують значення H_{225} , H_{255} , H_{286} , H_{350} , і за допомогою комп'ютерного обладнання за розробленим алгоритмом визначають: спектральні характеристики речовини - відносні значення висот піків h_{255} - при 255 нм, h_{286} - при 286 нм, h_{350} - при 350 нм шляхом ділення цих значень висот піка на висоту піка при 225 нм, і індекси схожості ідентифікаційних характеристик досліджуваної речовини і стандарту - I_T - індекс схожості часу утримування досліджуваної речовини і стандарту при $d=0,5$, I_{255} - індекс схожості спектральної характеристики досліджуваної речовини і стандарту на довжині хвилі 255 нм, I_{286} - індекс схожості спектральної характеристики досліджуваної речовини і стандарту на довжині хвилі 286 нм, I_{350} - індекс схожості спектральної характеристики досліджуваної речовини і стандарту на довжині хвилі 350 нм при значеннях d: 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3 по формулах:

$$I_T = 1 - \frac{|T_{st} - T_u|}{d},$$

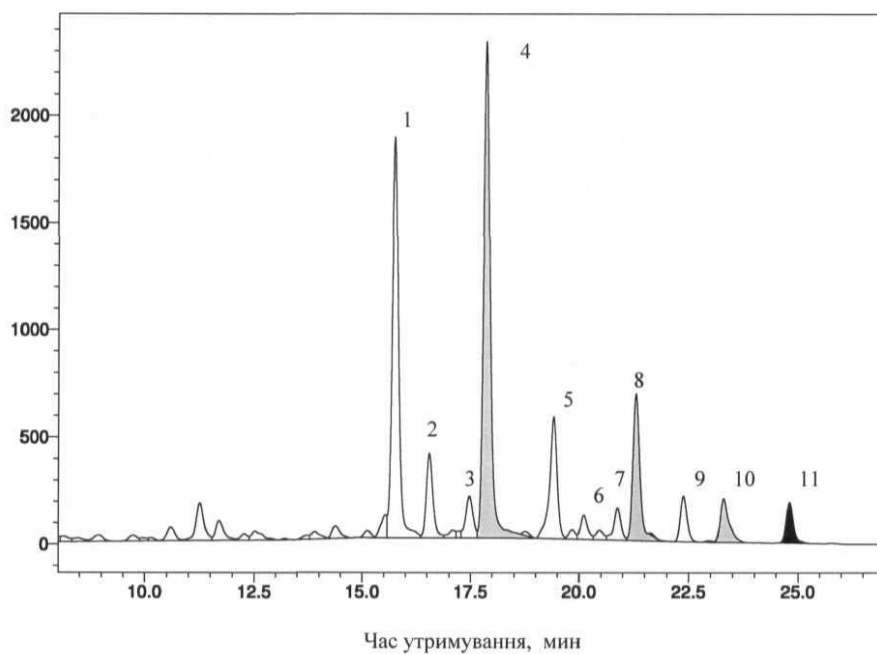
$$I_{255} = 1 - \frac{|h_{255_{st}} - h_{255_u}|}{d},$$

$$I_{286} = 1 - \frac{|h_{286_{st}} - h_{286_u}|}{d},$$

$$I_{350} = 1 - \frac{|h_{350_{st}} - h_{350_u}|}{d},$$

де T_{st} , $h_{255_{st}}$, $h_{286_{st}}$, $h_{350_{st}}$ - ідентифікаційні характеристики стандарту, T_u , h_{255_u} , h_{286_u} , h_{350_u} - аналогічні характеристики досліджуваної речовини, d - діапазон, в межах якого характеристики, що зрівнюються, вважаються схожими, для індексу I_T величина d означає припустиме відхилення часу утримування й дорівнює 0,5 хвилин, для індексів I_{255} , I_{286} , I_{350} значення d становлять: 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3, і, якщо індекси схожості для всіх характеристик більше 0 (при d не більшим 0,30 для спектральних характеристик і при d не більшим 0,5 для часу утримування), речовина вважається ідентичною стандарту.

Інтенсивність
абсорбції, мВ



Комп'ютерна верстка В. Мацело

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601