

**ОПИСАНИЕ
ИЗОБРЕТЕНИЯ
К ПАТЕНТУ**

(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ
СОБСТВЕННОСТИ

(19) **ВУ** (11) **15602**

(13) **С1**

(46) **2012.04.30**

(51) МПК

G 01N 30/02 (2006.01)

G 01N 33/02 (2006.01)

(54)

**СПОСОБ ИДЕНТИФИКАЦИИ ЭФИРНОГО МАСЛА
МНОГОКОЛОСНИКА МОРЩИНИСТОГО**

(21) Номер заявки: а 20101011

(22) 2010.07.01

(43) 2012.02.28

(71) Заявитель: Учреждение образования "Белорусский государственный технологический университет" (ВУ)

(72) Авторы: Коваленко Наталья Александровна; Супиченко Галина Николаевна; Леонтьев Виктор Николаевич; Шутова Анна Геннадьевна; Спиридович Елена Владимировна (ВУ)

(73) Патентообладатель: Учреждение образования "Белорусский государственный технологический университет" (ВУ)

(56) КОРОЛЮК Е.А. и др. Химия растительного сырья. - 2002. - № 1. - С. 49-52.

БАНАЕВА Е.А. и др. Химия растительного сырья. - 1999. - № 3. - С. 41-48.

ТКАЧЕВ А.В. и др. Химия растительного сырья. - 2002. - № 1. - С. 19-30.

ЖИГЖИТЖАПОВА С.В. и др. Химия растительного сырья. - 2008. - № 1. - С. 73-76.

КОРОЛЮК Е.А. и др. Химия растительного сырья. - 2002. - № 1. - С. 43-48.

КОРОЛЮК Е.А. и др. Химия растительного сырья. - 2002. - No. 1. - С. 53-56.

ORAV A. et al. Proc. Estonian Acad. Sci. Chem. - 2001. - V. 50. - № 4. - P. 217-225.

ШУТОВА А.Г. Изв. НАНБ. Сер. биол. наук. - 2006. - № 5. - С. 228-230.

ГОСТ 14618.5-78. Масла эфирные, вещества душистые и полупродукты их синтеза. Газохроматографический метод анализа.

(57)

Способ идентификации эфирного масла многоколосника морщинистого, заключающийся в том, что отбирают пробу эфирного масла, обрабатывают ее смесью гексана и ацетона, взятых в массовом соотношении 3:1, полученный раствор анализируют методом газо-жидкостной хроматографии с использованием метода внутренней нормализации без учета поправочных коэффициентов на хроматографе с пламенно-ионизационным детектором, стеклянной капиллярной колонкой длиной 30 м и внутренним диаметром 0,321 мм с использованием неподвижной фазы Cyclosyl B, содержащей оптически активный циклодекстрин, при линейной скорости газа-носителя азота 17,8 см/с и температуре детектора и испарителя 230 и 250 °С соответственно, в режиме программирования температуры от изотермы при 70 °С в течение 5 минут с подъемом температуры со скоростью 2°/мин до изотермы при 200 °С в течение 10 минут, определяют количественное соотношение характеристических пиков энантиомеров лимонена и пулегона и при содержании R-(+)-лимонена 95-98 % и S-(-)-пулегона 97-99 % масло относят к эфирному маслу многоколосника морщинистого.

Изобретение относится к способам идентификации продуктов переработки растительного сырья, а именно эфирного масла, полученного из многоколосника морщинистого (*Agastache rugosa* L.), и может быть использовано в химической, парфюмерной и пищевой промышленности, а также в медицине, фармации, сельском хозяйстве, метрологии и стандартизации.

Известно, что химический состав эфирных масел в значительной степени зависит от условий произрастания и фазы онтогенеза растений, от того, какая часть растения была использована для получения эфирного масла, а также от условий предварительной обработки использованного растительного сырья [1].

При анализе уровня техники выявлен способ экспресс-оценки качества ароматных (эфирных) масел и продуктов на их основе [2], характеризующийся тем, что он предусматривает использование детектирующего устройства - статического "пьезоэлектронного носа", матрицу которого формируют из восьми масс-чувствительных пьезосенсоров с пленками на электродах сорбентов, различных по полярности, нанесенных из растворов двух полярных, двух среднеполярных, двух неполярных хроматографических фаз, а также из растворов прополиса и триоктилфосфиноксида, в ячейку детектирования которого вводят равновесную газовую фазу предварительно термостатированного образца, представляющего собой пробу эфирного масла или продукта на его основе, регистрируют отклики каждого пьезосенсора, формируют суммарный сигнал в виде временной "массароматограммы" и сопоставляют ее с банком данных по результатам анализа проб-стандартов. Если идентичность суммарных сигналов составляет 60-80 %, то проба оценивается как низкачественная, при совпадении более чем на 80 % анализируемая проба соответствует по качеству стандарту, при совпадении суммарных сигналов менее 60 % анализируемая проба бракуется как не соответствующая стандарту.

Недостатками данного способа являются использование сложного детектирующего устройства на основе матрицы из пьезосенсоров, сложная и трудоемкая обработка полученных сигналов, а также невозможность использования заявленного метода для всех анализируемых объектов.

Известен способ выявления и идентификации ингредиентов синтетических или натуральных экстрактов растительного и животного происхождения, обладающих лекарственной ценностью, с использованием хроматографических "отпечатков пальцев" [3], заключающийся в том, что экстрагируют органические и метало-органические соединения из растений или животных или естественных или синтетических источников, обладающих лекарственной ценностью, с использованием соответствующего растворителя, отделяют полученный экстракт на основании рН и полярности с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), формируют контурную и трехмерную хроматограмму элюированных ингредиентов, преобразуют полученную хроматограмму в цветное изображение, которое затем анализируют с применением встроенного программного обеспечения для выявления всех его отдельных цветов с использованием координат, обозначающих все трехмерные свойства указанного изображения, обозначают концентрации отдельных ингредиентов, элюированных в течение времени, формируют хроматограмму на основе анализа цвета, имеющую пики при различных интервалах времени наряду со свойствами сопряженности связей ингредиентов, идентифицируют соединения в указанных элюированных ингредиентах по свойствам поглощения УФ видимого спектра различных соединений в изображении, идентифицируют, определяют и классифицируют элюированные соединения как полярные, среднеполярные, менее или неполярные на основании свойств полярности или сопряженности связей, генерируют штрих-код для выбранного пика, где ось X - время удержаний, ось Y - длина волны, R - число красных пикселей, G - количество зеленых пикселей и B - количество синих пикселей, формируют базу данных "отпечатков пальцев" и штрих-кодов и идентифицируют соответствующие соединения экстракта.

Недостатками данного способа являются длительность, сложность и трудоемкость предварительной подготовки пробы и выбора условий элюирования и хроматографирования для каждого из возможных анализируемых образцов, необходимость достаточных компьютерных мощностей для реализации и поддержания работоспособности заявленного способа, для реализации которого необходимо создание и поддержание библиотеки баз данных для как можно большего числа различных объектов анализа, а также создание нетрадиционного и сложного программного обеспечения для его реализации.

Также известен способ установления стандартных шаблонов для продуктов из лекарственных растений [4], включающий приготовление анализируемого раствора или анализируемого экстракта образца лекарственного растения, о котором известно, что оно обладает свойствами, подходящими для стандартизации, анализ упомянутого раствора или экстракта с помощью двух или более аналитических методов, включая комбинацию ЯМР-спектроскопии с методикой распознавания на основе компьютерной модели и одной или двух профилирующих биологических методик, и установление стандартных шаблонов для упомянутых анализируемых лекарственных растений на основании результатов, полученных вышеупомянутыми методами.

К недостаткам данного способа относится необходимость использования дорогостоящего ЯМР-метода, сложность и трудоемкость программного обеспечения, необходимого для реализации заявленного метода, а также невозможность его использования для всех образцов лекарственных растений, в том числе и для растений, не обладающих свойствами, подходящими для стандартизации.

Известен также способ определения страны или места происхождения контрабандной марихуаны [5], включающий разработку профилей сложных образцов из сырья растений марихуаны (*Cannabis*) из различных стран или различных географических мест с использованием капиллярного газохроматографического/масс-спектрометрического анализа и количественный анализ хроматографических пиков методом внутреннего стандарта, установление "главного" профиля и использование установленного положения профилей для сравнения с профилем неизвестного образца для идентификации происхождения. При этом экстракцию проводят органическим растворителем с добавлением внутреннего стандарта, а детектирование хроматографических пиков проводят с использованием масс-спектрометра.

Недостатками данного способа являются использование совмещенного метода анализа (газохроматографического и масс-спектрометрического), требующего высокой квалификации персонала, а также возможность использования данного способа применительно только к марихуане.

Также известен способ идентификации растительного сырья [6], заключающийся в том, что проводят анализ хлорнокислого экстракта измельченного образца растительного сырья методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с контролируемыми параметрами разделения и детектированием по флуоресценции и идентифицируют сырье путем выявления идентичности хроматограммы исследуемого образца с хроматограммой растения из библиотеки эталонных хроматограмм, полученных в таких же условиях. Данный способ является аналогом по отношению к заявленному изобретению.

Недостатками данного способа являются существенная зависимость разделения компонентов экстракта от трудноконтролируемых параметров хроматографирования, а также недостаточная селективность разделения энантиомеров методом ВЭЖХ, обусловленная блокированием хиральных полостей неподвижных фаз полярными модификаторами, входящими в состав растворителей.

Из доступных литературных источников нами не был выявлен способ идентификации эфирного масла многоколосника морщинистого.

Задачей данного изобретения является разработка относительно простого, надежного и информативного способа идентификации эфирного масла многоколосника морщинистого.

BY 15602 C1 2012.04.30

го (*Agastache rugosa* Z.), не зависящего от фазы онтогенеза растений, использованных для его получения, от способа предварительной подготовки используемого растительного сырья, а также сроков хранения готового эфирного масла.

Задача изобретения решается путем идентификации эфирного масла многоколосника морщинистого, заключающегося в том, что отбирают пробу эфирного масла, обрабатывают его смесью гексана и ацетона, взятых в массовом соотношении 3:1, полученный раствор анализируют методом газо-жидкостной хроматографии с использованием метода внутренней нормализации без учета поправочных коэффициентов на хроматографе с пламенно-ионизационным детектором, стеклянной капиллярной колонкой длиной 30 м и внутренним диаметром 0,321 мм с использованием неподвижной фазы Cyclosil B, содержащей оптически активный циклодекстрин, при линейной скорости газа-носителя азота 17,8 см/с и температуре детектора и испарителя - 230 и 250 °С соответственно, в режиме программирования температуры от изотермы при 70 °С в течение 5 мин с подъемом температуры со скоростью 2°/мин до изотермы при 200 °С в течение 10 мин, определяют количественное соотношение характеристических пиков энантиомеров лимонена и пулегона, и при содержании R-(+)-лимонена 95-98 % и S-(-)-пулегона 97-99 % масло относят к эфирному маслу многоколосника морщинистого.

При этом в процессе исследований было выяснено, что из всего набора выявленных при анализе веществ для двух идентифицированных компонентов - лимонена и пулегона - более 95 % их количества находится в форме определенных оптических изомеров, причем независимо от фазы онтогенеза растений, используемых для получения эфирного масла, от способа предварительной подготовки растительного сырья, а также от срока хранения готового эфирного масла количественное соотношение между содержанием энантиомеров каждого из этих веществ в эфирном масле многоколосника морщинистого сохраняется неизменным, что подтверждается данными исследований (табл. 1-3).

Таблица 1

Зависимость содержания (мас. %) энантиомеров лимонена и пулегона в эфирном масле *Agastache rugosa* L. от фазы онтогенеза (свежее растительное сырье)

Соединение	Лимонен			Пулегон		
	Содержание энантиомера, мас. %		Доля R-(+)-формы, %	Содержание энантиомера, мас. %		Доля S-(-)-формы, %
	S-(-)	R-(+)		S-(-)	R-(+)	
Начало цветения	0,70	14,16	95,3	20,68	0,10	99,5
Цветение	0,56	14,64	96,3	35,08	0,50	98,6
Окончание цветения	0,50	12,20	96,1	25,11	0,08	99,7

Таблица 2

Зависимость содержания (мас. %) энантиомеров лимонена и пулегона в эфирном масле *Agastache rugosa* L. от фазы онтогенеза (сухое растительное сырье)

Соединение	Лимонен			Пулегон		
	Содержание энантиомера, мас. %		Доля R-(+)-формы, %	Содержание энантиомера, мас. %		Доля S-(-)-формы, %
	S-(-)	R-(+)		S-(-)	R-(+)	
Начало цветения	0,17	5,70	97,1	16,16	0,41	97,5
Цветение	0,39	10,81	96,5	31,88	1,02	96,9
Окончание цветения	0,23	7,03	96,9	24,60	0,27	98,9

Зависимость содержания (мас. %) энантиомеров лимонена и пулегона в эфирном масле *Agastache rugosa* L. от длительности хранения

Соединение	Лимонен			Пулегон		
	Содержание энантиомера, мас. %		Доля R-(+)-формы, %	Содержание энантиомера, мас. %		Доля S-(-)-формы, %
	S-(-)	R-(+)		S-(-)	R-(+)	
Свежеприготовленный образец	0,39	15,21	97,5	35,50	0,43	98,9
Образец после хранения в течение 12 мес	0,25	7,97	96,9	20,66	0,17	99,2
Образец после хранения в течение 30 мес	0,08	3,66	97,8	9,37	0,05	99,5

Предел допускаемых значений относительной погрешности результата измерений $\pm 4\%$ при доверительной вероятности 0,95.

По данным проведенных исследований 95-98 % лимонена, содержащегося в эфирном масле многоколосника морщинистого в количестве ≈ 10 мас. %, приходится на R-(+)-лимонен, и 97-99 % пулегона, содержащегося в масле в количестве ≈ 35 мас. %, представлено S-(-)-форме.

Заявленный способ осуществляется следующим образом.

К навеске, предварительно высушенной в течение 24 ч безводным сульфатом натрия пробы эфирного масла массой 0,1000-0,3000 г, взятой на аналитических весах, добавляют 10,0-15,0 мл смеси гексан:ацетон в массовом соотношении 3:1. Затем отбирают аликвоту полученного раствора объемом 1 мкл, которую с помощью микрошприца вводят через испаритель в хроматографическую колонку газового хроматографа "Цвет-800", оснащенного пламенно-ионизационным детектором. Хроматографирование проводят на стеклянной капиллярной колонке длиной 30 м и внутренним диаметром 0,321 мм с использованием неподвижной фазы Cyclosil B (толщина 0,25 мкм) в токе газа-носителя азота с линейной скоростью потока 17,8 см/с, делении потока 23:1, при температуре испарителя и детектора - 230 и 250 °C соответственно в следующем режиме программирования температуры колонки: изотерма при 70 °C в течение 5 минут, подъем температуры со скоростью 2°/мин до 200 °C, изотерма при 200 °C в течение 10 мин.

На полученной хроматограмме идентифицируют и определяют количественное соотношение характеристических пиков энантиомеров лимонена и пулегона и при содержании R-(+)-лимонена 95-98 % и S-(-)-пулегона 97-99 % масло относят к эфирному маслу многоколосника морщинистого.

В качестве конкретных примеров, подтверждающих возможность осуществления заявленного способа, приводим хроматограммы многоколосника морщинистого, мяты лимонной и кориандра.

На фиг. 1 изображена хроматограмма эфирного масла многоколосника морщинистого (*Agastache rugosa* L).

На фиг. 2 показан фрагмент той же хроматограммы, включающий пики энантиомеров лимонена и пулегона.

На фиг. 3 показан фрагмент хроматограммы эфирного масла мяты лимонной, включающий пики энантиомеров лимонена и пулегона.

На фиг. 4 показан фрагмент хроматограммы эфирного масла кориандра посевного, включающий пики энантиомеров лимонена и пулегона.

Фрагменты хроматограмм различных эфирных масел существенно различаются между собой вплоть до того, что в них отсутствуют общие хроматографические пики.

ВУ 15602 С1 2012.04.30

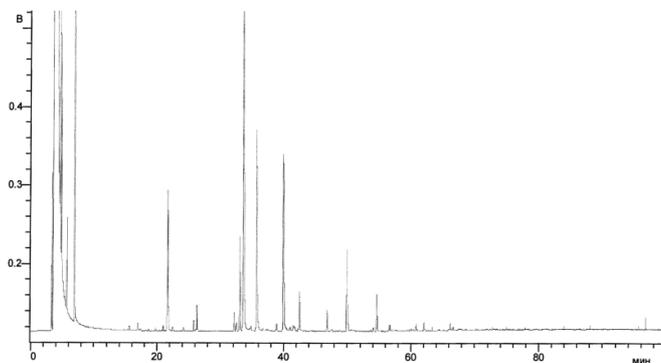
В эфирном масле многоколосника морщинистого лимонен представлен преимущественно в R-(+)-форме (95-98 %), пулегон - в S-(-)-форме (97-99 %). В эфирном масле мяты лимонной соотношение S-(-)- и R-(+)-форм лимонена составляет соответственно 70 и 30 %, пулегон в нем представлен только S-(-)-формой. В эфирном масле кориандра энантиомеры лимонена представлены в равных количествах, а пулегон отсутствует.

Очевидно, что количественное соотношение энантиомеров пулегона и лимонена для всех трех эфирных масел будет различным, что позволяет однозначно идентифицировать эфирное масло многоколосника морщинистого среди эфирных масел других наиболее распространенных растений.

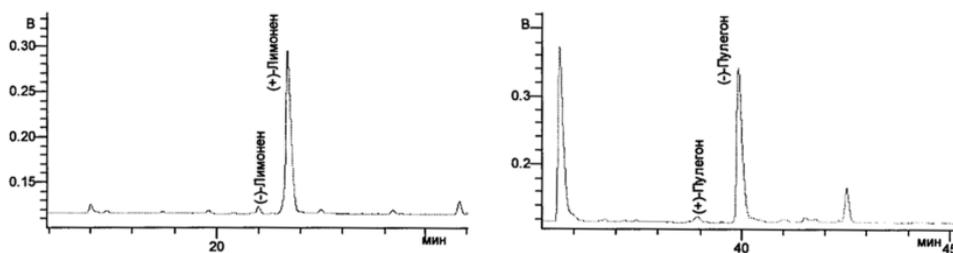
Таким образом, предлагаемый способ позволяет достаточно быстро и с высокой точностью идентифицировать эфирное масло многоколосника морщинистого независимо от фазы онтогенеза растений, использованных для его получения, от способа предварительной подготовки растительного сырья, а также сроков хранения готового эфирного масла. При этом отпадает необходимость идентификации всех отдельных пиков с помощью стандартов, причем для идентификации могут быть использованы даже фрагменты хроматограмм, содержащие пики энантиомеров лимонена и пулегона.

Источники информации:

1. Гуринович Л.К., Пучкова Т.В. Эфирные масла: химия, анализ и применение. - М.: Школа косметических химиков, 2005. - С. 192.
2. Патент RU 2327985 С1, МПК G 01N 33/03, 2008.
3. Патент EA 4663 В1, МПК G 01N 33/88, 2004.
4. Патент US 6806090 В1, МПК G 01N 33/00, 2004.
5. Патент US 5252490 А, МПК G 01N 33/00, 1993.
6. Патент ВУ 10273 С1, МПК G 01N 30/00, 2008.

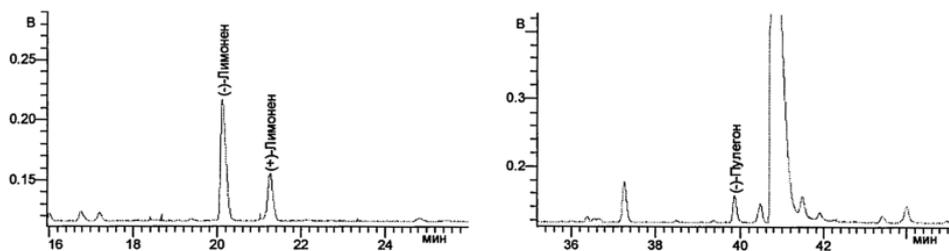


Фиг. 1

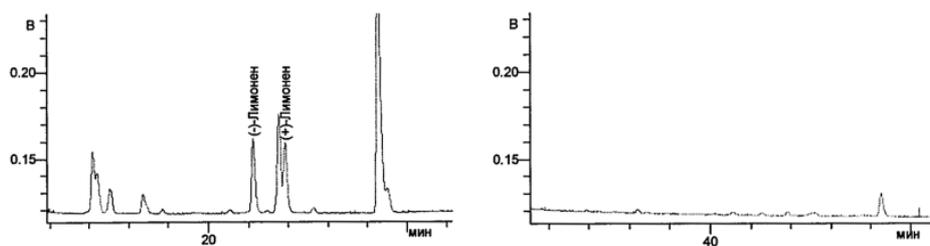


Фиг. 2

BY 15602 C1 2012.04.30



Фиг. 3



Фиг. 4