RZECZPOSPOLITA POLSKA

Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **218715**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **396820**

(22) Data zgłoszenia: **31.10.2011**

(51) Int.Cl.
G01N 30/90 (2006.01)
G01N 30/94 (2006.01)

(54) **Sposób rozdzielania i oznaczania związków w wieloskładnikowych mieszaninach roślinnych**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
13.05.2013 BUP 10/13

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
30.01.2015 WUP 01/15

(73) Uprawniony z patentu:
UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE, Lublin, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:
GRAŻYNA ELŻBIETA MATYSIK, Lublin, PL
ANNA WOŹNIAK, Lubartów, PL
ROMAN PADUCH, Lublin, PL
RYSZARD KOCJAN, Lublin, PL
HELENA DONICA, Lublin, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Anna Bełz

PL 218715 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób rozdzielania i oznaczania związków w wieloskładnikowych mieszaninach roślinnych.

W znanym stanie techniki rozdzielanie i oznaczanie związków w wieloskładnikowych mieszaninach roślinnych odbywa się przez rozwijanie chromatogramu rozpuszczalnikiem lub mieszaniną rozpuszczalników na dwóch oddzielnych płytkach chromatograficznych, przy czym najpierw prowadzi się w komorze chromatograficznej proces rozwijania płytki z próbką wzorcową, a następnie rozwija się płytkę chromatograficzną z badaną próbką wieloskładnikową. Po rozdzieleniu próbek na obu płytkach, prowadzi się identyfikację rozdzielonych związków próbki wieloskładnikowej poprzez porównywanie ich wartości R_F z wartościami R_F związków próbki wzorcowej.

Metoda ta stwarza szereg niedogodności, wynikających z braku jednolitych warunków równowagowych podczas prowadzenia procesu rozdzielania próbek na dwóch oddzielnych płytkach chromatograficznych, co z kolei prowadzi do nierzetelnych wyników procesu rozdzielenia i stwarza trudności w oznaczeniu rozdzielonych związków próbek wieloskładnikowych. Według tej metody nie można ustalić dokładnej czystości wyizolowanego pasma, gdyż trudne do ustalenia jest czy w danym paśmie oprócz zasadniczych związków podlegających oznaczeniu występują jeszcze jakieś inne związki.

Znany jest także z polskiego opisu patentowego nr PL 205357 sposób rozdzielenia jednocześnie dwóch próbek na jednej płytce to jest próbki wzorcowej i próbki badanej, co pozwala na identyfikację rozdzielonych związków próbki badanej względem próbek wzorcowych. Sposób ten polega na tym, że nanosi się próbkę związków wzorcowych oraz próbkę mieszaniny związków oznaczanych na płytkę chromatograficzną o wymiarach prostokątnych, przy jej krótszych brzegach, zachowując odstęp pomiędzy naniesionymi próbkami, i prowadzi się proces rozwijania chromatogramu najpierw w tradycyjnym kierunku wzdłuż krótszych brzegów płytki, a następnie po odparowaniu fazy ruchomej, obróceniu płytki o 90° i dostarczeniu kolejnej fazy ruchomej, kontynuuje się rozwijanie chromatogramu w kierunku prostopadłym. Po zakończeniu procesu rozwijania otrzymuje się na polu płytki z rozdzielonymi próbkami obraz przypominający lustrzane odbicie rozdzielonych próbek wzorcowych, przy czym pasma rozdzielonych związków pozostają w takiej samej odległości względem linii środkowej jak pasma związków wzorcowych próbek.

Według opisanej metody nie zawsze uzyskiwano pełne rozdzielenie próbek, dotyczy to zwłaszcza przypadków, gdy pasma rozdzielanych związków nie zawierały wyraźnie wyodrębnionych dominujących związków zawartych w próbce, związki te występowały łącznie wraz z innymi towarzyszącymi im związkami. Ponadto pasma, które zawierały związki o podobnych właściwościach R_F, znacznie utrudniały analizę rozdzielanych związków. W niektórych przypadkach trudno było ustalić ile związków było obecnych w pasmach rozdzielanej próbki, przez co proces rozdzielania był mniej rzetelny, a analiza rozdzielanych związków znacznie utrudniona.

Sposób według wynalazku polega na tym, że na płytkę chromatograficzną o wymiarach prostokątnych, przy jej jednym brzegu nanosi się próbkę mieszaniny związków oznaczanych i rozwija chromatogram w pierwszym kierunku - tradycyjnym fazą ruchomą którą stanowiła mieszanina toluenu i octanu etylu korzystnie w stosunku 93 : 7 v/v, następnie po odparowaniu fazy ruchomej obraca się płytkę o 90° i prowadzi się proces zatężania - prekoncentracji rozdzielonych pasm związków, korzystnie na dystansie 0,8 - 2,0 cm od miejsca naniesienia próbki, stosując jako fazę ruchomą mieszaninę także mieszaninę toluenu i octanu etylu, korzystnie w stosunku 92 : 8 v/v, przy czym czynność zatężania powtarza się aż do momentu uzyskania wąskich i zwartych poprzednio rozdzielonych pasm, a po każdorazowym zatężaniu wyjmuje się płytkę z komory i dokładnie suszy, po czym po uzyskaniu żądanych kształtów pasm prowadzi się proces rozwijania w kierunku prostopadłym, przy czym proces rozdzielania mieszaniny zawierającej związki o różnej polarności prowadzi się na dystansie pozostałej długości płytki.

Wynalazek przez zastosowanie procesu zatężania rozdzielonych pasm związków umożliwia uzyskanie prawidłowych - zwartych kształtów pasm, co prowadzi do sprawnego rozdzielania związków zawartych w próbce mieszaniny. Dzięki tej metodzie związek dominujący w próbce jest wyraźnie wydzielony od innych związków towarzyszących, występujących w mniejszej ilości.

Dominujące związki mają zwartą i wyraźną postać, przez co mogą być poddane dalszej analizie np. spektralnej przy ustalaniu struktury związków. Sposób według wynalazku umożliwia także rzetelniejszą ocenę właściwości farmakologicznych związków. Metoda pozwala ponadto na rozdzielanie

mieszaniny zawierającej związki także polarne (trudniej rozdzielane znanymi metodami) poprzez wydłużenie dystansu rozdzielania maksymalnie na pozostałą długość płytki.

Sposób w przykładzie wykonania pokazany jest na rysunku, na którym figura 1a przedstawia naniesione na płytkę próbki przy jednym brzegu płytki. Figura 1b pokazuje chromatogram po rozwinięciu w pierwszym tradycyjnym kierunku z wykorzystaniem techniki izokratycznej, zaś figura 1c przedstawia chromatogram obrazujący proces zatężania rozdzielonych pasm na dystansie 0,8 - 2,0 cm od miejsca naniesienia próbki, fig. 2 pokazuje rozdzielenie związków dominujących i towarzyszących występujących w rozdzielanej próbce olejku jałowcowego przy zastosowaniu chromatografii dwukierunkowej 2D-TLC. Plamki wywołano poprzez deprywatyzację roztworem aldehydu anyżowego w kwasie siarkowym VI, stosując 0,5 ml aldehydu anyżowego, 10% ml kwasu octowo-lodowatego, 85 ml metanolu oraz 5 ml 95% kwasu siarkowego VI. Fazę ruchomą, zastosowaną do rozwijania płytki w pierwszym kierunku, stanowiła mieszanina toluenu i octanu etylu w stosunku 93 : 7 v/v.

Fazę ruchomą, zastosowaną po obróceniu płytki o 90°, była mieszanina toluenu i octanu etylu w stosunku 92 : 8 v/v, trzykrotnie użyta. Pomiędzy poszczególnymi etapami analizy płytka była starannie suszona przez ok. 20 minut w strumieniu ciepłego powietrza, a po wysuszeniu ogrzewana w temperaturze 100°C do momentu pojawienia się plamek.

Jednym z głównych składników występujących w badanym materiale był octan linalolu oznaczony jako 3, który rozdzielił się na cztery dodatkowe związki, które oznaczono: 3a (R_F = 0,63), 3b (R_F = 0,54), 3c (R_F = 0,28) oraz 3d (R_F = 0,11).

Innym pasmem zawierającym związki dominujące i towarzyszące związki to pasmo z numerem 9 (R_F = 0,34). Pasmo to rozdzieliło się na 5 następujących związków 9a (R_F = 0,28), 9b (R_F = 0,27), 9c (R_F = 0,22), 9d (R_F = 0,10), 9e (R_F = 0,06), co ilustruje densytogram fig. 3.

W kolejnym przykładzie dokonano analizy rozdzielenia składników olejku tymiankowego. Wykorzystano w tym celu wyżej opisaną metodę, stosując fazę ruchomą opisaną także w pierwszym przykładzie I.

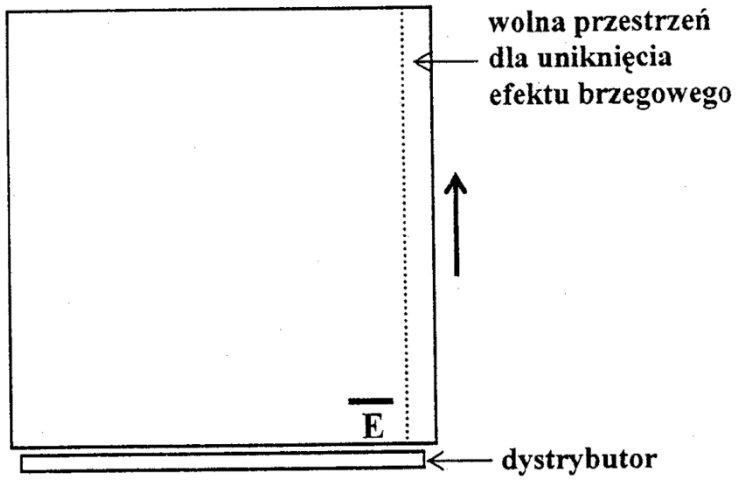
Efekt rozdzielenia składników ilustruje rysunek fig. 4 oraz densytogram - fig. 5.

Jednym z głównych składników, które zidentyfikowano było pasmo tymololu oznaczone 3 (R_F = 0,59), które rozdzieliło się na dwa dodatkowe związki 3a i 3b, pasmo nr 4 - 1,8 cyneol (R_F = 0,55), które rozdzieliło się na cztery dodatkowe związki 4a, 4b, 4c, 4d, pasmo o numerze 6 - linalol (R_F = 0,37), które rozdzieliło się na trzy dodatkowe związki 6a, 6b, 6c, pasmo o numerze 8 - borneol (R_F = 0,28), które rozdzieliło się na cztery dodatkowe związki 8a, 8b, 8c, 8d.

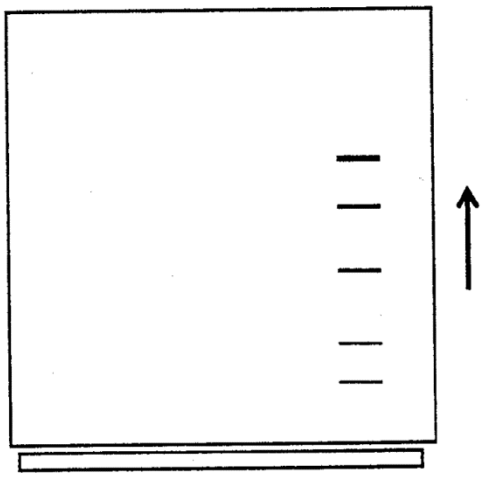
Zastrzeżenie patentowe

Sposób rozdzielania i oznaczania związków w wieloskładnikowych mieszaninach roślinnych, polegający na naniesieniu na płytkę szklaną z adsorbentem próbki mieszaniny związków i rozwijaniu chromatogramu mieszaniną rozpuszczalników w pierwszym kierunku tradycyjnym, a następnie, po odparowaniu fazy ruchomej, zastosowaniu kolejnej fazy ruchomej, rozwijaniu chromatogramu w kierunku prostopadłym, **znamienny tym**, że na płytkę chromatograficzną o wymiarach prostokątnych, przy jej jednym brzegu nanosi się próbkę mieszaniny związków oznaczanych i rozwija chromatogram w pierwszym kierunku - tradycyjnym fazą ruchomą którą stanowiła mieszanina toluenu i octanu etylu, korzystnie w stosunku 93 : 7 v/v, następnie po odparowaniu fazy ruchomej obraca się płytkę o 90° i prowadzi się proces zatężania - prekoncentracji rozdzielonych pasm, korzystnie na dystansie 0,8 - 2,0 cm, stosując jako fazę ruchomą także mieszaninę toluenu i octanu etylu korzystnie w stosunku 92 : 8 v/v, przy czym czynność zatężania powtarza się aż do momentu uzyskania wąskich i zwartych poprzednio rozdzielonych pasm, a po każdorazowym zatężaniu wyjmuje się płytkę z komory i dokładnie suszy, po czym po uzyskaniu żądanych kształtów pasm prowadzi się proces rozwijania w kierunku prostopadłym, przy czym proces rozdzielania mieszaniny zawierającej związki o różnej polarności prowadzi się na dystansie pozostałej długości płytki.

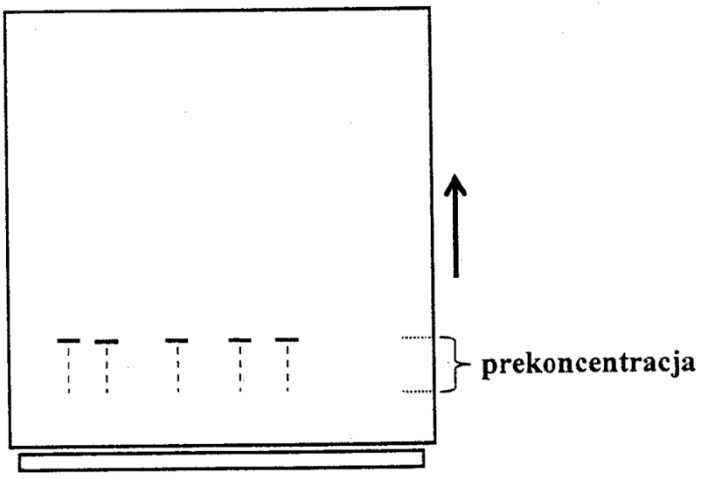
Rysunki



1 a



1 b



1 c


1
2a
2b
2
3a
2c
4
5
3
6
6a
7
2d
8
3b
6b
9
6c
1a
3c
10
6d
9c
11
6e
12
6f
2e
9d
3d
9e

Fig. 2

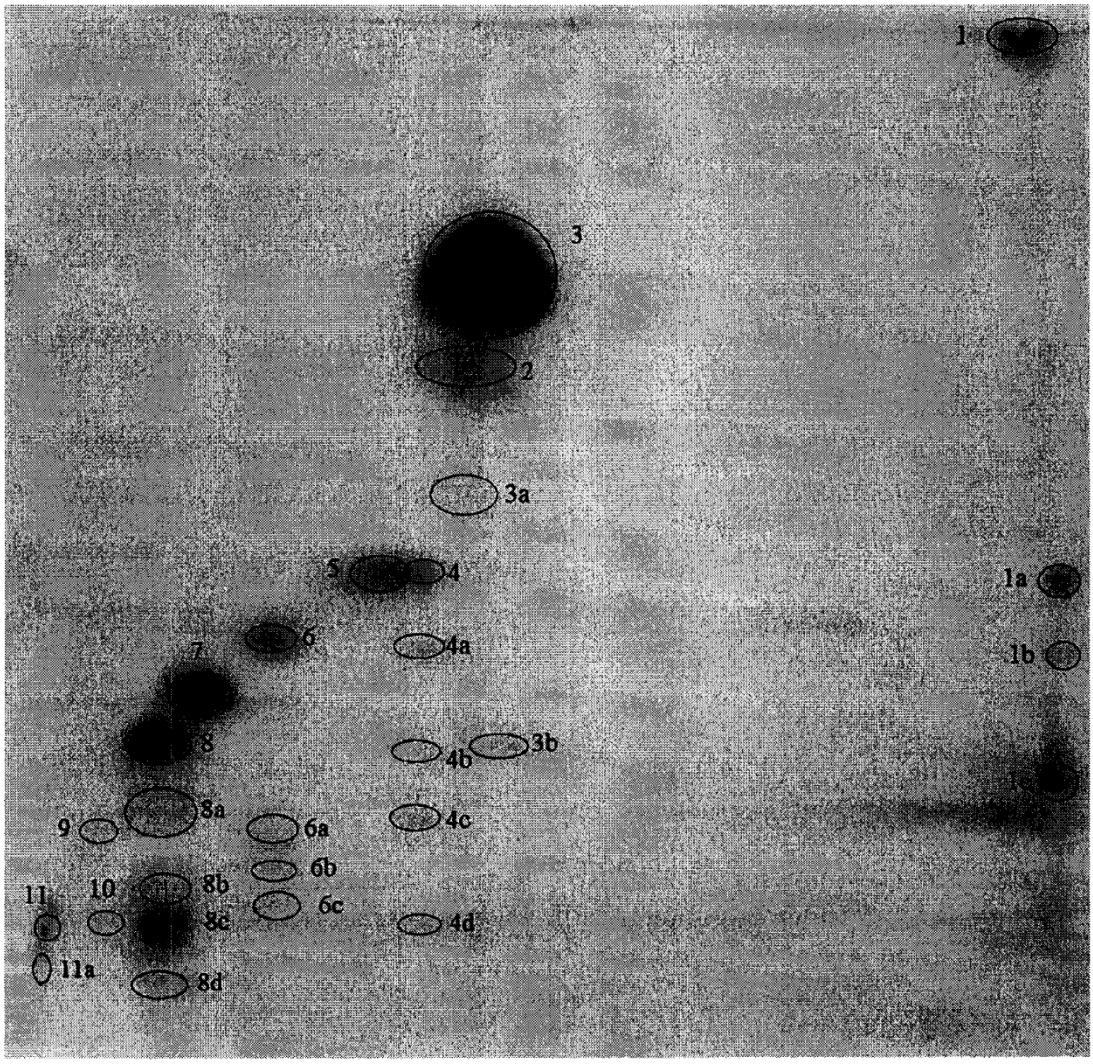


Fig. 3

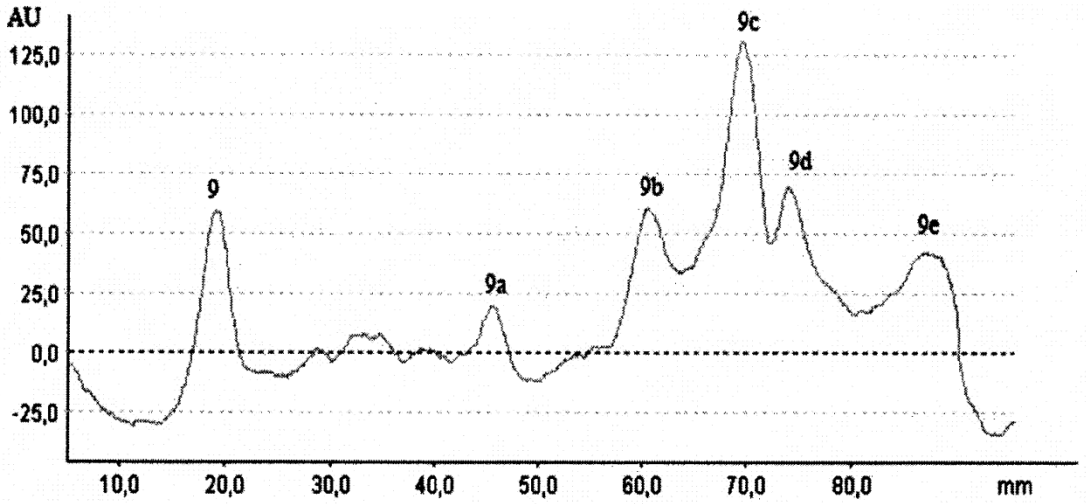

AU
125,0
100,0
75,0
50,0
25,0
0,0
-25,0
9
9a
9b
9c
9d
9e
10,0
20,0
30,0
40,0
50,0
60,0
70,0
80,0
mm

Fig. 4

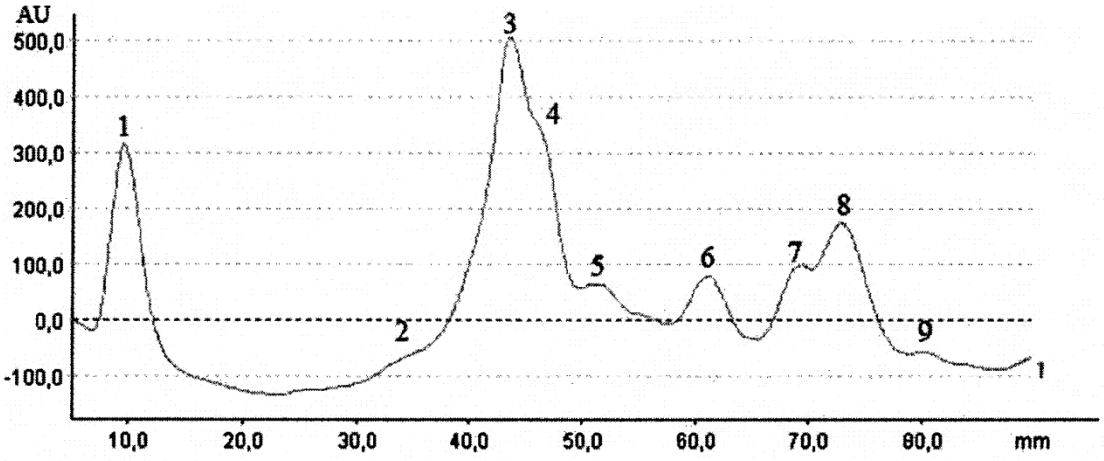

AU
500,0
400,0
300,0
200,0
100,0
0,0
-100,0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10,0
20,0
30,0
40,0
50,0
60,0
70,0
80,0
mm

Fig. 5

Departament Wydawnictw UPRP
Cena 2,46 zł (w tym 23% VAT)