



(12) **BREVET DE INVENȚIE**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată  
în termen de 6 luni de la data publicării

(21) Nr. cerere: 92-0879

(22) Data de depozit: 26.06.1992

(30) Prioritate:

(41) Data publicării cererii:  
30.12.1993 BOPI nr. 12/1993

(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:  
30.10.2000 BOPI nr. 10/2000

(45) Data eliberării și publicării brevetului:  
BOPI nr.

(61) Perfecționare la brevet:  
Nr.

(62) Divizată din cererea:  
Nr.

(86) Cerere internațională PCT:  
Nr.

(87) Publicare internațională:  
Nr.

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
US 4731334; EP 0187717

(71) Solicitant: GUDUMAC VALENTIN, CHIȘINĂU, MO; GULEA AURELIAN, CHIȘINĂU, MO; RUDIC VALERIU, CHIȘINĂU, MO; SANDU ION, IAȘI, RO; CREȚU VIOREL, DOROHOI, RO;

(73) Titular: GUDUMAC VALENTIN, CHIȘINĂU, MO; GULEA AURELIAN, CHIȘINĂU, MO; RUDIC VALERIU, CHIȘINĂU, MO; SANDU ION, IAȘI, RO; CREȚU VIOREL, DOROHOI, RO;

(72) Inventatori: GUDUMAC VALENTIN, CHIȘINĂU, MO; GULEA AURELIAN, CHIȘINĂU, MO; RUDIC VALERIU, CHIȘINĂU, MO; SANDU ION, IAȘI, RO; CREȚU VIOREL, DOROHOI, RO;

(74) Mandatar:

(54) **METODĂ SPECTROFOTOMETRICĂ PENTRU DETERMINAREA SELENIULUI**

(57) **Rezumat:** Invenția se referă la o metodă spectrofotometrică de determinare a seleniului din biomasă de spirulină, utilizată în urmărirea proceselor biotehnologice de obținere a unor proteine sau a altor substanțe biologice active sau din probe necesare unor procese din industria sticlei. După răcire, la temperatura camerei, o soluție apoasă, rezultată prin dezagregarea acidă/alcalină a unei probe, se aduce la un  $pH = 3$ , prin adăugarea unei soluții tampon de hidroxid de sodiu de concentrație 10%, stabilizându-se  $pH$ -ul la o valoare egală cu 2,5...3, cu o soluție tampon constituită din acid citric și citrat de sodiu 0,1 M în anioni citrat. Se

extrag prin scuturare din faza apoasă, în prezență de antioxidant, cationii prezenți, cu excepția seleniului, iar soluția apoasă cu conținut de seleniu se acidulează cu acid clorhidric de concentrație 37%, când valoarea  $pH$ -ului devine zero. Antioxidantul utilizat este o soluție de ditizonă  $5 \cdot 10^{-5} M$ , în tetraclorură de carbon, cu conținut de 2,6-ditertbutil, 4-metilfenol de concentrație 0,2% cu rol de agent de solubilizare pentru ditizonă în tetraclorură de calciu.

Revendicări: 2

RO 116128 B



Invenția se referă la o metodă spectrofotometrică de determinare a seleniului din biomasă de spirulină, utilizată în urmărirea proceselor biotehnologice de obținere a unor proteine sau a altor substanțe biologic active sau din probe necesare unor procese din industria sticlei.

5 Se cunoaște o metodă fluorescentă pentru determinarea seleniului din diferite biomase: nutrețuri, plante, alge, microorganisme care utilizează pentru complexarea Se (IV), 3,3-diaminobenzidină [Barcer C.A., Harvey L.C., *Analist.* 1962, 87, p.558, Lott P.F., Cucor P.J. *Analiyst.Chem.* 1963, 35, p.1459] sau 2,3-diaminonaftalină [Broad W.C., Berrand A.T., *Chemist. Analiyst* 1961, 50 p.124, Kovalski V.V., Ermakov V.V., *Jurnal analiticescoi himii*, 1966, 21, p.447.] Această metodă, cu toate  
10 că prezintă sensibilitate și reproductibilitate bună, are dezavantajul utilizării unor reactivi deficitari și a unor aparate specifice mai rar folosite. De asemenea, metoda este complexă, solicitând foarte multe etape de separare în procesul de extracție.

De asemenea, se cunoaște o metodă spectrofotometrică care utilizează reacția  
15 de complexare a Se (IV) cu ditizonă, urmată de extracția complexului format în tetraclorura de carbon și spectrofotometrirea acesteia [Scerbov D.P. și alții, *Zavodskaja laboratoria*, 1967, 6 683, Krașkov A.P., *Oșnovi analiticeskoi himii*, "Himia", Moskva, 1965, Mobuchi H.Nakohara L., *Bull. Chem.Soc.Japan.* 1963, 36, 151]. În acest sens, biomasa se mineralizează prin dezagregare acidă cu o soluție ce conține HClO<sub>4</sub>  
20 57% și câteva picături de HNO<sub>3</sub>, la o temperatură de 135 ... 140°C, timp de 90 ... 120 min, utilizând o baie de nisip. Soluția rezultată se aduce la un pH de circa 2,5 ... 3 cu o soluție de NaOH 10 %. Peste proba astfel obținută, se adaugă circa 15 cm<sup>3</sup> o soluție de ditizonă în tetraclorură de carbon, când din soluția apoasă se extrag sub formă de ditionați complecși de Fe (III), Hg (II), Cu(II), Ni(II), Zn(II), Mg(II), Te(IV), Mo(VI).  
25 Extracția se repetă de câteva ori. Soluția apoasă rămasă se evaporă până la un volum de circa 10 cm<sup>3</sup>, apoi se acidulează cu un volum egal de soluție HCl 37 %, când rezultă circa 20 cm<sup>3</sup> soluție 6 M HCl, cu un pH de 0,5, optim pentru complexarea Se (IV) cu ditizonă. În acest sens, peste soluția obținută se adaugă 5 ... 10 cm<sup>3</sup> soluție de ditizonă 5.10<sup>-5</sup> M în CCl<sub>4</sub> și se agită timp de 1 ... 2 min. După stabilizare, faza  
30 organică de culoare galben-verzui se separă și se spectrofotometrează la 2 lungimi de undă: la 410 nm pentru ditizonat de Se (IV) și 620 nm pentru ditizonă.

Această metodă prezintă dezavantajul unei sensibilități relativ mici, care se datorează solubilității scăzute a ditizonei în CCl<sub>4</sub>. Din această cauză, pentru prepararea  
35 soluției respective se folosește agitarea continuă, timp de câteva ore, într-o cameră obscură. De asemenea, soluția organică de ditizonă este foarte instabilă. Din această cauză, imediat după preparare, această soluție trebuie să fie folosită. Realizarea pH-ului (2,5) optim pentru extracția celorlalți cationi, destul de greoaie, prezintă, de asemenea, un neajuns considerabil.

Problema pe care o rezolvă invenția este mărirea sensibilității și reproductibilității metodei printr-o mai bună separare a Se (IV) din mediul care conține și alți  
40 cationi.

Metoda, conform invenției elimină dezavantajele menționate, prin aceea că, după răcire, la temperatura camerei, o soluție apoasă rezultată prin dezagregarea acidă alcalină a unei probe se aduce la un pH =3 prin adăugarea unei soluții tampon  
45 de hidroxid de sodiu de concentrație 10 %, stabilizându-se pH-ul la o valoare egală cu 2,5 ... 3 cu o soluție tampon, constituită din acid citric și citrat de sodiu 0,1 M în

anioni citrat, după care se extrag prin scuturare din faza apoasă, în prezență de antioxidant, cationii prezenți, cu excepția seleniului, iar soluția apoasă cu conținut de seleniu se acidulează cu acid clorhidric de concentrație 37 %, când valoarea pH-ului devine zero. Antioxidantul util este o soluție de ditizonă  $5 \cdot 10^{-5}M$ , în tetraclorură de carbon, cu conținut de 2,6- diterțbutil,4-metilfenol de concentrație 0,2 %, cu rol de agent de solubilizare pentru ditizonă în tetraclorură de calciu.

50

Probele se prelevează din biomasă de spirulină utilizată în procese biotehnologice care sunt necesare urmării unor procese din industria sticlei.

Prin aplicarea metodei conform invenției se obțin următoarele avantaje :

55

- precizia metodei oferă o înaltă reproductibilitate și sensibilitate ;
- se permite aplicarea și la probe care conțin urme de Se ;
- utilizarea compusului 2,6 - diterțbutil, 4-metilfenolului permite, pe de o parte, mărirea solubilității ditizonei în  $CCl_4$ , iar pe de altă parte, stabilizarea soluției organice de ditizonă;

60

- se oferă o bună separare a Se (IV) de ceilalți cationi din soluția apoasă, prin realizarea cu ajutorul unui sistem tampon a unui pH = 3 stabil și optim pentru procesul de extracție ;

- se solicită un număr redus de etape în procesul de extracție cu soluții organice a Se (IV) ;

65

- se permite aplicarea, după procesul de dezagregare, și în cadrul altor sisteme cu conținut de Se.

Se dă în continuare un exemplu de realizare a metodei, conform invenției.

Într-un pahar Berzelius, din sticlă termorezistentă, se iau  $0,2 \text{ cm}^3$  biomasă cu concentrația 10 g/l, peste care se adaugă  $0,2 \text{ cm}^3$  soluție  $HClO_4$  concentrație 57% și 1 ... 2 picături  $HNO_3$  concentrat. Se încălzește la temperatura de 130 ... 140°C, timp de 100 ... 130 min pe o baie de nisip, până când soluția devine transparentă. După răcire la temperatura camerei, soluția se aduce la pH = 3, prin adăugare de 0,1 ... 0,15  $\text{cm}^3$  o soluție de NaOH 10% și se stabilizează pH-ul prin adăugare de 1  $\text{cm}^3$  soluție tampon acid citric - citrat de sodiu 0,1 M în anioni citrat și cu un pH = 3.

70

75

Utilizând o soluție de ditizonă în  $CCl_4$ , stabilizată cu 0,2 % Ionol (2,6 - diterțbutil, 4-metilfenol) ca antioxidant, se extrag prin scuturare din faza apoasă la pH = 3 toți ceilalți cationi, cu excepția Se (IV). Operația se repetă de 2 ... 3 ori. Soluția apoasă, care conține Se (IV), se acidulează cu 1  $\text{cm}^3$  soluție acid clorhidric concentrat (37%), când pH-ul coboară la 0, devenind optim pentru extracția Se (IV) cu ditizonă. În acest sens, se folosesc 2  $\text{cm}^3$  soluție de ditizonă  $5 \cdot 10^{-5}M$  stabilizată cu Ionol 0,2 % care se adaugă peste soluția apoasă și care se agită timp de 1 ... 2 min, după care faza organică se separă și se spectrofotometrează, utilizând două lungimi de undă: respectiv, maximul de la 410 nm pentru ditizonatul de Se (IV) și cel de la 620 nm pentru ditizonă. Calcularea densității optime a ditizonatului de Se (IV) se face în baza relației :

80

85

$$A_{410}^{Se} = A_{410}^{extract} - K A_{620}^{extract}$$

în care :

90

$A_{410}^{Se}$  - densitatea optică a ditizonatului de Se la lungimea de undă de 410 nm ;

# RO 116128 B

$A_{410}^{extract}$  - densitatea optică a extractului la lungimea de undă de 410 nm ;

$A_{620}$  - densitatea optică a extractului la lungimea de undă de 620 nm ; 95

$K$  - constantă ce reprezintă raportul dintre densitatea optică la 410 nm și densitatea optică la 620 nm pentru ditizonă pură (pondere de participare).

100

## Revendicări

1. Metodă spectrofotometrică de determinare a seleniului din probe constând din biomasă de spirulină utilizată în procese biotehnologice sau din probe necesare urmării unor procese din industria sticlei, prin reacția de complexare a seleniului cu reactivi specifici, urmată de extracția complexului format în vederea fotometrării, **caracterizată prin aceea că**, după răcire, la temperatura camerei, o soluție apoasă rezultată prin dezagregarea acidă alcalină a unei prob, se aduce la un  $pH = 3$ , prin adăugarea unei soluții tampon de hidroxid de sodiu de concentrație 10 %, stabilizându-se  $pH$ -ul la o valoare egală cu 2,5 ... 3, cu o soluție tampon constituită din acid citric și citrat de sodiu 0,1 M în anioni citrat, după care se extrag prin scuturare din faza apoasă, în prezență de antioxidant, cationii prezenți, cu excepția seleniului, iar soluția apoasă cu conținut de seleniu se acidulează cu acid clorhidric de concentrație 37 %, când valoarea  $pH$ -ului devine zero. 105

2. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** antioxidantul utilizat este o soluție de ditizonă  $5 \cdot 10^{-5} M$ , în tetraclorură de carbon, cu conținut de 2,6-diterțbutil,4-metilfenol de concentrație 0,2 %, cu rol de agent de solubilizare pentru ditizonă în tetraclorură de calciu. 110

Președintele comisiei de invenții : **chim. Hăulică Mariela**

Examinator : **ing. Florea Stela**





(12) **BREVET DE INVENȚIE**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată  
în termen de 6 luni de la data publicării

(21) Nr. cerere: **92-0879**

(61) Perfecționare la brevet:  
Nr.

(22) Data de depozit: **26.06.1992**

(62) Divizată din cererea:  
Nr.

(30) Prioritate:

(86) Cerere internațională PCT:  
Nr.

(41) Data publicării cererii:  
**30.12.1993** BOPI nr. **12/1993**

(87) Publicare internațională:  
Nr.

(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:  
**30.10.2000** BOPI nr. **10/2000**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**US 4731334; EP 0187717**

(45) Data eliberării și publicării brevetului:  
BOPI nr.

(71) Solicitant: **GUDUMAC VALENTIN, CHIȘINĂU, MD; GULEA AURELIAN, CHIȘINĂU, MD; RUDIC VALERIU, CHIȘINĂU, MD; SANDU ION, IAȘI, RO; CREȚU VIOREL, DOROHOI, RO;**

(73) Titular: **GUDUMAC VALENTIN, CHIȘINĂU, MD; GULEA AURELIAN, CHIȘINĂU, MD; RUDIC VALERIU, CHIȘINĂU, MD; SANDU ION, IAȘI, RO; CREȚU VIOREL, DOROHOI, RO;**

(72) Inventatori: **GUDUMAC VALENTIN, CHIȘINĂU, MD; GULEA AURELIAN, CHIȘINĂU, MD; RUDIC VALERIU, CHIȘINĂU, MD; SANDU ION, IAȘI, RO; CREȚU VIOREL, DOROHOI, RO;**

(74) Mandatar:

(54) **METODĂ SPECTROFOTOMETRICĂ PENTRU DETERMINAREA SELENIULUI**

(57) **Rezumat:** Invenția se referă la o metodă spectrofotometrică de determinare a seleniului din biomasă de spirulină, utilizată în urmărirea proceselor biotehnologice de obținere a unor proteine sau a altor substanțe biologice active sau din probe necesare unor procese din industria sticlei. După răcire, la temperatura camerei, o soluție apoasă, rezultată prin dezagregarea acidă/alcalină a unei probe, se aduce la un  $pH = 3$ , prin adăugarea unei soluții tampon de hidroxid de sodiu de concentrație 10%, stabilizându-se  $pH$ -ul la o valoare egală cu 2,5...3, cu o soluție tampon constituită din acid citric și citrat de sodiu 0,1 M în anioni citrat. Se

extrag prin scuturare din faza apoasă, în prezență de antioxidant, cationii prezenți, cu excepția seleniului, iar soluția apoasă cu conținut de seleniu se acidulează cu acid clorhidric de concentrație 37%, când valoarea  $pH$ -ului devine zero. Antioxidantul utilizat este o soluție de ditizonă  $5 \cdot 10^{-5}M$ , în tetraclorură de carbon, cu conținut de 2,6-diterțbutil, 4-metilfenol de concentrație 0,2% cu rol de agent de solubilizare pentru ditizonă în tetraclorură de calciu.

Revendicări: 2

VERSIONE CORECTATĂ - CORRECTED VERSION  
Semnalat în: / Referred to in: BOPI 12/2000

RO 116128 B

