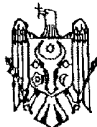




MD 2247 G2 2003.08.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) **2247** ⁽¹³⁾ **G2**
(51) Int. Cl.⁷: G 01 J 3/12;
C 07 J 71/00

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. depozit: a 2002 0186 (22) Data depozit: 2002.07.23	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2003.08.31, BOPI nr. 8/2003
(71) Solicitant: INSTITUTUL NAȚIONAL DE FARMACIE, MD (72) Inventatori: VALICA Vladimir, MD; IURASOVA Valentina, MD; FILIPPOV Mihail, MD (73) Titular: INSTITUTUL NAȚIONAL DE FARMACIE, MD	

(54) **Procedeu de determinare a concentrației de tomatozidă în extractul uscat
din semințe de tomate**

(57) **Rezumat:**

1
Invenția se referă la un procedeu de determinare a concentrației de tomatozidă în extractul uscat din semințe de tomate și poate fi aplicată în chimie și medicină.

Procedeu solicitat constă în dizolvarea extractului uscat din semințe de tomate în soluție de alcool etilic de 40..50%, adăugarea la soluția obținută a reactivului Ehrlich în raport de 1:2 corespunzător. Termostatarea amestecului reactant obținut se realizează la temperatura de 40°C în

2
5 decurs de cel puțin 60 min, iar diluarea soluției complexului colorat format cu metanol se efectuează în raport de 3:1 corespunzător. Apoi se măsoară densitatea optică a soluției colorate și se calculează după valoarea ei concentrația tomatozidei.

10
Rezultatul invenției constă în accelerarea procedurii, precum și în mărirea exactității lui.
Revendicări: 1

MD 2247 G2 2003.08.31

3

Descriere:

Invenția se referă la un procedeu de determinare a concentrației de tomatozidă (TMZ) în extractul uscat din semințe de tomate (EUST) și poate fi aplicată în chimie și medicină.

5 Procedeu solicitat este bazat pe studierea glicozidelor furostanolice, la care se atribuie și TMZ, formând un compus colorat cu p-dimetilaminobenzaldehidă (PABA) în mediu acid (reactivul Ehrlich-RE).

10 Este cunoscut un procedeu de determinare a concentrației de TMZ în extractul uscat din semințe de tomate numit Pacoverin, ce prevede dizolvarea lui în etanol 96%, evaporarea 1 ml de această soluție, uscarea rezidului la temperatura de $100 \pm 5^\circ\text{C}$, răcirea ultimului până la temperatura camerei, adăugarea la el a 0,2 ml RE, care reprezintă o soluție de 2% PABA în amestec cu $\text{CH}_3\text{OH}:\text{HCl}_{\text{conc.}}$ în proporție de 60:40% vol., termostatarea amestecului reactant la temperatura de 40°C în decurs de cel puțin 40 min, dizolvarea soluției complexului colorat prin adăugarea a 3,8 ml metanol, măsurarea densității optice în maximumul de adsorbție la $\lambda=518 \pm 2$ nm și calcularea concentrației de tomatozidă [1].

15 Dezavantajul procedurii dat constă în aceea că dizolvarea extractului uscat, evaporarea acestei soluții, uscarea și răcirea rezidului până la temperatura camerei sunt niște procese extinse în timp.

Problema pe care o rezolvă invenția dată constă în accelerarea analitică a determinării TMZ în extractul uscat din semințe de tomate pe baza reducerii timpului de dizolvare a extractului, cu excepția operațiilor de evaporare, uscare și răcire a rezidului până la temperatura camerei.

20 Aceasta se datorește faptului că în procedeu de determinare a concentrației de TMZ în EUST se prevede dizolvarea lui în soluție alcoolică, adăugarea la această soluție a reactivului Ehrlich care reprezintă o soluție din 2% PABA în amestec cu $\text{CH}_3\text{OH}:\text{HCl}_{\text{conc.}}$ = 60:40% vol., termostatarea amestecului reactant obținut la $t=40^\circ\text{C}$, diluarea soluției complexului colorat format cu metanol, măsurarea densității optice a acestei soluții și calcularea după valoarea ei a concentrației de TMZ, unde extractul uscat se dizolvă în soluție de alcool etilic de 40...50%. La această soluție se adaugă RE în raport de 1:2 corespunzător. Amestecul reactant se termostatează în decurs de cel puțin 60 min și soluția complexului colorat format se diluează cu metanol în raport de 3:1 corespunzător.

25 Pentru determinarea parametrilor optimi de realizare a procedurii, în particular a fost găsit cel mai bun solvent pentru EUST, au fost determinate volumele optime ale soluțiilor reagenților în reacția cercetată EUST cu PABA, temperatura optimă și durata termostatării amestecului reactant.

30 Datele cercetărilor sunt prezentate în tabelele 1-3.

Tabelul 1

Diluarea extractului uscat

$C_{\text{EUST}}=0,5$ mg/ml			
nr.	Dizolvant	$D_{k(0,5\text{ cm})}$	Diluarea extractului uscat
1	30% etanol	-	greu solubil, opalescență mare
2	40% etanol	0,6750	ușor solubil la temperatura camerei
3	50% etanol	0,5764	ușor solubil la temperatura camerei
4	96% etanol	0,4852	solubil la încălzire ($t=50...70^\circ\text{C}$)

35 **Notă:** C_{EUST} – concentrația extractului uscat din semințe de tomate; $D_{k(0,5\text{ cm})}$ – densitatea optică a soluției complexului colorat EUST cu RE înregistrată în chiuvete cu grosimea stratului de absorbție de 0,5 cm.

40 Conform datelor din tabelul 1 putem conchide, că extractul uscat se dizolvă ușor în etanol de 40...50% formând soluții nespumoase și neopalescente spre deosebire de soluțiile hidroalcoolice cu o concentrație mai mică a etanolului, ceea ce permite de a pregăti rapid soluțiile inițiale.

Reacția RE cu soluțiile EUST în etanol de 40% este mai sensibilă. Pe măsura măririi concentrației dizolvantului hidroalcoolic concentrația etanolului tinde să micșoreze sensibilitatea reacției cercetate, ce se manifestă prin schimbarea densității optice D_k a soluției complexului colorat.

45 Pe lângă aceasta, coeficientul de refracție al etanolului de 40% depinde într-o măsură mai mică de temperatură, spre deosebire de etanolul de 96%, aceasta influențează pozitiv asupra exactității și siguranței metodei propuse.

Soluțiile din extract uscat și TMZ în etanol de 96% nu formează spumă și opalescență, însă dizolvarea este relativ anevoioasă și se realizează la temperatura de 60...70°C, pentru aceasta se consumă mult timp.

MD 2247 G2 2003.08.31

4

Tabelul 2

Dependența D_k de raportul volumului soluțiilor reagenților în reacția de formare a complexului EUST cu RE

5 $C_{EUST}=0,66 \text{ mg/ml}$

Conținutul reactivului Erlich			Amestecul reactant		Dizolvarea	$D_{k(0,5 \text{ cm})}$ a soluției fotometrate peste τ min după stoparea reacției			
PABA, %	HCl, %	CH ₃ OH, %	V_{EUST} , ml	V_{RE} , ml	V_{CH_3OH} , ml	0	30	60	90
2	40	60	1	1	2	0,2233	0,2260	0,2248	0,2262
2	40	60	1	2	1	0,5812	0,5792	0,5824	0,5865
2	40	60	1	3	-	0,7529	0,7901	0,8147	0,8467

Notă: V_{EUST} – volumul soluției EUST în etanol de 40%; V_{RE} – volumul RE; V_{CH_3OH} – volumul metanolului.

10 În tab. 2 sunt prezentate datele dependenței densității optice D_k a soluției complexului colorat de raportul volumului soluțiilor EUST în etanol de 40%, de asemenea de volumul reactivului Erlich și metanolului, folosite pentru diluarea soluției fotometrate. De asemenea sunt aduse schimbările D_k a soluției fotometrate în timp după oprirea reacției.

15 S-a dovedit, că la adăugarea soluției EUST în etanol de 40% a RE și ulterior diluarea soluției complexului colorat format cu metanol raportul 1:2:1 este optim. Pe lângă aceasta, valoarea densității optice D_k a soluției fotometrate după terminarea reacției rămâne constantă în timp, ce dă dovadă de un echilibru stabil și o rezistență a complexului format, asigurând o bună reproducere a rezultatelor, și prin urmare o exactitate și o siguranță a procedurii.

20 Valoarea densității optice D_k a soluției fotometrate în corelație cu volumele reagenților indicați 1:1:2 după stoparea reacției de asemenea este stabilă în timp, totuși valoarea absolută a ei este destul de mică pentru analiza spectrală.

Tabelul 3

Dependența D_k a soluției complexului TMZ cu RE de temperatura și timpul de termostatare a amestecului reactant

$(C_{TMZ})=0,5 \text{ mg/ml}$

Timpul, τ min	$D_k(0,5 \text{ cm})$		
	58°C	40°C	30°C
5	0,4958	0,1653	0,0900
10	0,5041	0,2948	0,1578
20	0,4828	0,4318	0,2308
30	0,4537	0,5360	0,3294
40	0,4539	0,6044	0,4087
60	0,4129	0,6650	0,5309
70	0,3952	0,6722	0,5710
120	0,3322	0,6546	0,7211

25 Analiza datelor prezentate în tab. 3 arată că condițiile optime de termostatare, și anume temperatura de 40°C și timpul de termostatare de cel puțin 60 min, asigură exactitatea și siguranța metodei din contul atingerii stabilității colorării soluției a complexului format.

La o temperatură de termostatare mai înaltă, intensitatea colorației soluției complexului format se micșorează în timp din cauza hidrolizei tomatozidei și scindării parțiale a complexului format.

30 Termostatarea amestecului reactant la $t=30^\circ\text{C}$ în decurs de cel puțin 60 min nu permite atingerea stării de echilibru a reacției; se urmărește creșterea în timp a intensității colorației soluției fotometrate a complexului format, ce influențează negativ asupra reproducerii și exactității rezultatelor.

Exemple de realizare

35 Determinarea tomatozidei în extractul natural uscat pe baza reacției de formare a complexului cu PABA se realizează astfel: se pregătește soluția EUST în alcool etilic de 40% cu concentrația EUST (C_{EUST}) de 0,5 mg/ml, iar pentru construirea graficului de calibrare soluția de tomatozidă se dizolvă în același solvent în limitele concentrației 0,1...1,0 mg/ml. Într-o eprubetă se introduce 1 ml de soluție EUST și TMZ, se adaugă 2 ml de reactiv Erlich, eprubeta cu amestecul reactant se închide cu un dop rodat și se termostatează la temperatura de 40°C cel puțin 60 min, apoi se adaugă 1 ml metanol.

40 Densitatea optică D_k în maximumul de adsorbție a soluției complexului colorat se înregistrează la spectrometru la $\lambda=518\pm 2 \text{ nm}$, în cuve cu grosimea stratului de adsorbție de 0,5 cm.

MD 2247 G2 2003.08.31

5

Pentru compensare în fasciculul de comparare se folosește 1 ml etanol de 40%, prelucrat în mod analog probei analizate a EUST.

5 În calitate de obiect pentru comparație (cea mai apropiată soluție) a fost folosită metoda cunoscută de determinare a tomatozidei în extractul uscat din semințe de tomate, în care reacția de formare a complexului RE s-a realizat în EUST, obținut prin evaporarea 1 ml de această soluție în etanol de 96%, urmând uscarea rezidului la $t=100\pm 5^{\circ}\text{C}$, la care s-au adăugat 0,2 ml RE, care reprezintă soluția de 2% PABA în amestec cu $\text{CH}_3\text{OH} : \text{HCl}_{\text{conc}}$ în raport de 60:40% vol., termostatarea amestecului s-a realizat la $t=40^{\circ}\text{C}$ timp de 40 min, iar dizolvarea soluției complexului format s-a realizat prin adăugarea a 3,8 ml metanol.

10 Datele referitoare la timpul cheltuit pentru determinarea concentrației TMZ în EUST conform metodei propuse și conform celei mai apropiate soluții sunt prezentate în tab. 4.

Tabelul 4

Timpul cheltuit la desfășurarea etapelor reacțiilor de formare a complexilor EUST cu RE

Nr.	Etapile principale ale reacției RE cu EUST	Cea mai apropiată soluție τ , min	Invenția solicitată τ , min
		Dizolvantul EUST (etanol 96%)	Dizolvantul EUST (etanol 40%)
1.	Diluarea EUST	30	5-10
2.	Evaporarea până la sec a soluției obținute	60	-
3.	Răcirea rezidului uscat EUST până la temperatura camerei	20	-
4.	Termostatarea amestecului reactant EUST cu RE	40	60
5.	Dizolvarea soluției complexului și înregistrarea densității optice a lui	20	20
6.	Timpul sumat de desfășurare a unei probe de analiză EUST	~3 h	~1 h 30 min
7.	Exactitatea metodei	$\varepsilon_{\text{rel.}}=1,3\%$	$\varepsilon_{\text{rel.}}=0,79\%$

15 Analizând datele obținute putem menționa, că viteza de determinare a concentrației de tomatozidă în extractul uscat din semințe de tomate după procedeul propus crește de două ori față de procedeul cunoscut, totodată și exactitatea lui este mai mare.

20

(57) Revendicare:

Procedeu de determinare a concentrației de tomatozidă în extractul uscat din semințe de tomate care include dizolvarea acestui extract în soluție alcoolică, adăugarea la soluția obținută a reactivului Ehrlich, care reprezintă o soluție din 2% de p-dimetilaminobenzaldehidă în amestec cu alcool metilic și acid clorhidric concentrat în raport de 60 : 40 corespunzător, termostatarea amestecului reactant obținut la temperatura de 40°C , diluarea soluției complexului colorat format cu metanol, măsurarea densității optice a soluției colorate și calcularea după valoarea ei a concentrației de tomatozidă, **caracterizat prin aceea că** extractul uscat se dizolvă în soluție de alcool etilic de 40...50%, la soluția obținută se adaugă reactivul Ehrlich în raport de 1:2 corespunzător, amestecul reactant se termostatează în decurs de cel puțin 60 min, iar soluția complexului colorat se diluează cu metanol în raport de 3:1 corespunzător.

30

(56) Referințe bibliografice:

1. MD 1972 G2 2002.07.31

Șef Secție:

GUȘAN Ala

Examinator:

BAZARENCO Tatiana

Redactor:

LOZOVANU Maria

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2002 0186		
(22) Data depozit: 2002.07.23		
(51) ⁷ : G 01 J 3/12; C 07 J71/00 Alți indici de clasificare: Titlul : Procedeu de determinare a concentrației de tomatozidă în extractul uscat din semințe de tomate (71) Solicitantul : INSTITUTUL NAȚIONAL DE FARMACIE, MD Termeni caracteristici : tomatozidă, glicozide steroidice, determinarea		
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl. (7))		
(MD, EA, SU) MD 1994 – 2002; EA – 1996 – 2002; SU – fond BRIT Int. Cl. ⁷		
II. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	MD 1972	1
A	П.К. Кинтя, Г.В. Лазуревский. Стероидные гликозиды ряда спиростана, Кишинев, Штиинца, 1979г., стр. 123	
A	К.Г. Гурелидзе, Пасепниченко В.А., Васильева И.С., Прикладная биохимия и микробиология, 1986. т. 22, № 1, стр. 131-136	
☐ Documentele următoare sunt indicate în continuare a rubricii II		☐ Informația referitoare la brevete paralele se anexează
* categoriile speciale ale documentelor consultate:		P - document publicat înainte de data de depozit dar după data priorității invocate
A - document care definește stadiul anterior general		T - document publicat după data de depozit sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria care conține baza invenției
E - document anterior dar publicat la data de depozit național reglementar sau după aceasta data		X - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă
L - document care poate pune în discuție data priorității invocate, poate contribui la determinarea datei publicării altor divulgări sau pentru un motiv expres (se va indica motivul)		Y - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă cand documentul este asociat cu unul sau mai multe alte documente de aceeași natură, aceasta combinație fiind evidentă pentru o persoană de specialitate
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere sau orice altă		& - document care face parte din aceeași familie de documente
Data finalizării documentării		2003.05.29
Examinatorul		Bazarenco Tatiana

RAPORT DE DOCUMENTARE

Informația referitoare la brevete paralele		(21) Nr depozit:	
Date de identificare ale documentelor citate în raport	Data publicării	Brevete paralele	Data publicării
1	2	3	4