



MD 585 Y 2013.01.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **585** (13) **Y**
(51) Int.Cl: *C07D 311/32* (2006.01)
G01N 25/14 (2006.01)
G01N 21/75 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ**

În termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție de scurtă durată, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: s 2012 0065 (22) Data depozit: 2012.04.13	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2013.01.31, BOPI nr. 2/2013
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD (72) Inventatori: VALICA Vladimir, MD; FILIPPOV Mihail, MD; ȘEPELI Diana, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD (74) Mandatar autorizat: VOZIANU Maria	

(54) **Procedeu de determinare cantitativă a flavonoizilor în materia primă vegetală**

(57) Rezumat:

1

Invenția se referă la domeniul farmaceutic, în special la un procedeu de determinare cantitativă a flavonoizilor în materia primă vegetală.

Conform procedului revendicat, se efectuează extragerea materiei prime vegetale cu etanol de 70...75%, tratarea cu clorură de aluminiu, determinarea fotometrică a densității optice a extractului și calcularea cantității de

2

flavonoizi, iar înainte de extragerea cu etanol materia primă se extrage cu cloroform, după care cloroformul se decantează, iar faza solidă se usucă, totodată densitatea optică a extractului se determină la 404 nm și grosimea stratului de absorbție de 0,1 cm, iar cantitatea de flavonoizi se exprimă prin cantitatea de quercetină.

Revendicări: 1

MD 585 Y 2013.01.31

(54) Method for quantitative determination of flavonoids in vegetable raw material

(57) Abstract:

1
The invention relates to the pharmaceutical field, in particular to a method for quantitative determination of flavonoids in vegetable raw material.

According to the claimed method, it is carried out the extraction of vegetable raw material with 70...75% ethanol, treatment with aluminum chloride, photometric determination of the optical density of the extract and calculation of the amount of flavonoids, and prior to ethanol extraction the raw material is

2
extracted with chloroform, then the chloroform is decanted, and the solid phase is dried, at the same time the optical density of the extract is determined at 404 nm and the thickness of the absorbed layer of 0.1 cm, and the amount of flavonoids is expressed through the amount of quercetin.

Claims: 1

(54) Способ количественного определения флавоноидов в растительном сырье

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к фармацевтической области, в частности к способу количественного определения флавоноидов в растительном сырье.

Согласно заявленному способу, осуществляют экстракцию растительного исходного сырья 70...75%-ным этанолом, обработку хлоридом алюминия, фотометрическое определение оптической плотности экстракта и расчет количества

2
флавоноидов, а перед экстракцией этанолом исходное сырье экстрагируют хлороформом, после чего хлороформ декантируют, а твердую фазу высушивают, при этом оптическую плотность экстракта определяют при 404 нм и толщине абсорбируемого слоя в 0,1 см, а количество флавоноидов выражают через количество кверцетина.

П. формулы: 1

Descriere:

Invenția se referă la domeniul farmaceutic, în special la un procedeu de determinare cantitativă a flavonoizilor în materia primă vegetală.

5 Este cunoscut procedeul de determinare cantitativă a flavonoizilor în materia primă vegetală pe baza schimbării densității optice la maximumul de absorbție al complexilor de flavonoizi cu clorură de aluminiu (AlCl_3). În acest scop se propune fierberea cantității exacte de material vegetal timp de 20...30 min cu etanol 30...70% în raport de 1:(100...200) într-un balon cu un răcitor cu reflux, după care se efectuează răcirea, se aduce cu etanol corespunzător la masa inițială, proba alicvotă filtrată a extractului se tratează cu soluție de clorură de aluminiu
10 (AlCl_3) în etanol 70% și se măsoară densitatea optică a soluției la lungimea de undă analitică de 410...415 nm la un spectrofotometru pe fonul probei care nu este tratată cu clorură de aluminiu și este acidulată cu acid acetic. În paralel, în aceleași condiții se efectuează experiența și cu proba cu 1,5 ml de soluție de rutină 0,1%. Conținutul de flavonoizi se calculează în unități de rutină [1].

15 Dezavantajele principale ale procedurii cunoscute sunt: la determinare se presupune că numai flavonoizii (FL) formează un complex cu AlCl_3 , nu se ia în considerație efectul de denaturare asupra rezultatelor analizei de formare a complexului compușilor secundari cu AlCl_3 . În primul rând se denaturează rezultatele analizei din cauza prezenței clorofilei extrase din plantă cu alcool etilic. Clorofila în regiunea 350...450 nm are așa-numitele benzi de absorbție Soret, intensitatea de absorbție a căreia scade după acțiunea cu AlCl_3 care afectează
20 rezultatele analizei. Determinarea în mai multe etape duce la o creștere a timpului analizei și include obținerea extractului, luarea de probă alicvotă, prepararea soluției de lucru și a soluției de referință cu și fără adaos de AlCl_3 , prepararea soluției standard de rutină, de asemenea, cu și fără adaos de AlCl_3 . Rezultatele analizei se exprimă în unități de rutină, dar dacă materialul analizat conține FL, alții decât de rutină, este necesară recalcularea luând în considerație diferența dintre masele lor moleculare. Deci, în dependență de raportul probei de rutină : quercetină se observă o schimbare în intensitatea de absorbție a luminii, diferența dintre absorbția de rutină și quercetină crește la deplasarea absorbției totale la lungimi de undă mai
25 lungi, ceea ce duce la o denaturare foarte puternică a rezultatelor de determinare a FL. Dacă măsurile fotometrice se efectuează în intervalul 410...415 nm, atunci rezultatele analizei depind foarte mult de compoziția flavonoizilor extractului.

Problema pe care o soluționează invenția constă în elaborarea unui procedeu de determinare cantitativă a flavonoizilor în materia primă vegetală cu un număr mai mic de operații luând în
considerație impactul asupra rezultatelor de determinare și a compușilor extractibili secundari.

35 Conform procedurii revendicate, se efectuează extragerea materiei prime vegetale cu etanol de 70...75%, tratarea cu clorură de aluminiu, determinarea fotometrică a densității optice a extractului și calcularea cantității de flavonoizi, iar înainte de extragerea cu etanol materia primă se extrage cu cloroform, după care cloroformul se decantează, iar faza solidă se usucă, totodată densitatea optică a extractului se determină la 404 nm și grosimea stratului de absorbție de 0,1 cm, iar cantitatea de flavonoizi se exprimă prin cantitatea de quercetină.
40

Avantajele invenției propuse constau în aceea că la extracția preliminară cu cloroform se reușește lichidarea influenței componentelor secundare, inclusiv a clorofilei, asupra determinării flavonoizilor, aplicarea unui exces mare de etanol 70...75% permite extragerea completă a FL și simplificarea procedurii de determinare; fotometria extractului cu adaos de
45 AlCl_3 în punctul isosbestic la 404 nm, unde se intersectează curbele de absorbție ale complexilor de rutină și quercetină cu AlCl_3 permite de a calcula printr-un mod mai comod și de a exprima cu exactitate rezultatele de determinare a FL într-un extract din materie primă vegetală.

50 Rezultatul invenției constă în: simplificarea procedurii de determinare, reducerea numărului de operațiuni în determinarea FL, micșorarea influenței compușilor secundari și a clorofilei asupra rezultatului analizei.

Procedeul de determinare cantitativă a flavonoizilor se realizează în modul următor: la 20 mg de materie primă se toarnă 10...15 ml de cloroform și se încălzește într-un balon conectat la un răcitor cu reflux la temperatura de fierbere timp de 85...95 min. După răcire faza lichidă se decantează. Înainte de eliminarea fazei solide din balon se efectuează uscarea ei într-o etuvă
55 la temperatura de 50...60°C. La faza solidă uscată se toarnă 10 ml de etanol 70...75% și se efectuează extracția într-un balon cu răcitor cu reflux la temperatura de fierbere timp de

85...95 min. După răcire, balonul se deconectează de la răcitor. La 3 ml de extract se adaugă 1 ml de soluție apoasă de AlCl_3 0,1 M.

Peste 20...30 min se fotometrează soluția complexului flavonoizilor cu AlCl_3 la 404 nm la grosimea stratului de absorbție de 0,1 cm.

- 5 Rezultatele analizei se exprimă în procente de greutate ale agliconului (quercetină – CQ) prin formula:

$$CQ = \frac{17,6 \times D \times n \times V \times 100}{m \times (100 - W)},$$

unde:

CQ – cantitatea de quercetină, în %;

- 10 D – densitatea optică a extractului, valori absolute;

n – coeficientul de diluare a extractului alcoolic cu soluție de clorură de aluminiu, valori absolute;

V – volumul de etanol, ml;

m – masa materiei prime, mg;

- 15 W – umiditatea materiei prime, %.

Umiditatea materiei prime vegetale se determină prin metoda prevăzută în Farmacopeea de Stat [Государственная фармакопея СССР, издание 11-е, том. 1, Медицина, Москва, 1987, с. 285-286].

- 20 Recalcularea rezultatului analizei pentru altă flavonoidă rutină se efectuează prin înmulțirea raportului masei moleculare a flavonoidei rutină anhidră $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$ (RUT) la masa moleculară de quercetină anhidră $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$ (CQ), care este aglicon al rutinei:

$$CQ = \frac{17,6 \cdot D \cdot n \cdot V \cdot 100}{m \cdot (100 - W)} \times \frac{M_{RUT}}{M_{CQ}}$$

Masa moleculară a rutinei $M_{RUT} = 610,5$ [http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5280805&loc=ec_rcs].

- 25 Masa moleculară a quercetinei $M_{CQ} = 302,2$ [http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5280343&loc=ec_rcs].

- La determinarea cantitativă a FL conform procedurii propus la extragerea preliminară a materiei prime vegetale cu cloroform este eliminat cel puțin componentul principal care împiedică la determinarea flavonoizilor – clorofila, care este prezentă în toate plantele, precum și alți compuși secundari. FL din materie primă vegetală nu se extrag cu cloroform. Folosirea unui exces mare de etanol 70...75% (raport 1:500...1000) asigură extragerea completă a FL, exclude procedura ulterioară de diluare a extractului la pregătirea soluțiilor fotometrice, aceasta permite reducerea volumelor extractului (până la 10 ml) și a soluțiilor fotometrice (până la 4 ml), ce simplifică esențial procesul de determinare. Extractul cu adaos de AlCl_3 se fotometrează în punctul isosbestic la 404 nm, unde se intersectează curbele de absorbție ale complexelor de rutină trihidrat 0,001M ($\text{RUT} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $M = 664,56$) [http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=16218542&loc=ec_rcs] și quercetină dihidrat 0,001M ($\text{CQ} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $M = 338,2$) [http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=16218542&loc=ec_rcs], obținuți după prelucrarea cu soluție apoasă de 0,1M AlCl_3 , adică în punctul coeficienților molari de extracție egali ai lor $\varepsilon_{404} = 1,716 \cdot 10^4 \text{ l} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Se determină concentrația molară totală a componentelor FL anhidre. Recalcularea conținutului (%) oricărui component al amestecului de flavonoizi se efectuează prin înmulțirea rezultatului de fotometrie la masa moleculară a flavonoidului-standard. Recalcularea conținutului de FL în cantitatea sumară de aglicon (quercetină) este cea mai comodă și precisă, deci în acest caz rezultatele analizei sunt mai puțin dependente de compoziția FL extractului. De asemenea, activitatea biologică a FL este determinată în principal de aglicon, și, respectiv, evaluarea farmacologică a extractului se determină de asemenea prin suma totală de aglicon.

Exemplu

- 50 La 20,27 mg de frunze uscate de sunătoare (m), cu conținutul de umiditate 6% (W) se toarnă 10 ml de cloroform și se încălzește într-un balon conectat la un răcitor cu reflux la temperatura de fierbere timp de 90 min. După răcire faza lichidă se decantează. Faza solidă

rămasă într-un balon se spală cu 5 ml de cloroform. Neeliminând faza solidă din balon se efectuează uscarea ei într-o etuvă la temperatura de 50...60°C. La faza solidă uscată se toarnă 10 ml de etanol 70% (V), se încălzește într-un balon cu răcitor cu reflux la temperatura de fierbere timp de 90 min. După răcire balonul se deconectează de la răcitor. La 3 ml de extract

5 se adaugă 1 ml de soluție apoasă de AlCl_3 0,1 M. $n = 4/3 = 1,33$ – coeficientul de diluare a extractului alcoolic după adăugarea la el a soluției de AlCl_3 . Peste 20 min se măsoară densitatea optică a soluției complexului flavonoizilor cu AlCl_3 la 404 nm la grosimea stratului de absorbție de 0,1 cm. A fost obținută valoarea $D = 0,207$.

Conținutul FL în recalcul pe quercetină se calculează după formula sus-menționată.
10 Conținutul flavonoizilor în frunzele de sunătoare a constituit 2,43%. După recalcularea pe rutină conținutul FL a constituit 5,13%.

Conținutul FL în petalele florilor de sunătoare a constituit 3,19%. După recalcularea pe rutină conținutul FL a constituit 6,44%.

Cercetările au fost efectuate în Centrul Științific în Domeniul Medicamentului al USMF
15 „Nicolae Testemițanu” și în Laboratorul Metode Fizico-Chimice de Cercetare și Analiză al Institutului de Chimie al AȘM. Au fost efectuate 34 de cercetări experimentale.

20

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. SU 1507394 A1 1989.09.15

(57) Revendicări:

Procedeu de determinare cantitativă a flavonoizilor în materia primă vegetală, care constă în extragerea materiei prime vegetale cu etanol de 70...75%, tratarea cu clorură de aluminiu, determinarea fotometrică a densității optice a extractului și calcularea cantității de flavonoizi, **caracterizat prin aceea că** înainte de extragerea cu etanol materia primă se extrage cu cloroform, după care cloroformul se decantează, iar faza solidă se usucă, totodată densitatea optică a extractului se determină la 404 nm și grosimea stratului de absorbție de 0,1 cm, iar cantitatea de flavonoizi se exprimă prin cantitatea de quercetină, care se determină conform formulei, în %:

$$CQ = \frac{17,6 \times D \times n \times V \times 100}{m \times (100 - W)},$$

unde:

CQ – cantitatea de quercetină, în %;

D – densitatea optică a extractului, valori absolute;

n – coeficientul de diluare a extractului alcoolic cu soluție de clorură de aluminiu,
valori absolute;

V – volumul de etanol, ml;

m – masa materiei prime, mg;

W – umiditatea materiei prime, %.

Director Departament:

GUȘAN Ala

Examinator:

IUSTIN Viorel

Redactor:

CANȚER Svetlana

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii		
(21) Nr. depozit: s 2012 0065 (22) Data depozit: 2012.04.13 (71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD (54) Titlul: Procedeu de determinare cantitativă a flavonoizilor în materia primă vegetală (32) Data de prioritate recunoscută: Raport de documentare internațională: ☐ da		
II. Clasificarea obiectului invenției:		
(51) Int.Cl: C07D 311/32 (2006.01) G01N 25/14 (2006.01) G01N 21/75 (2006.01)		
III. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare reprezentative)		
MD - Intern « Documentare Invenții » (inclusiv cereri nepublicate; trunchiere automată stanga/dreapta): „Determinare cantitativă”, flavonoizi, quercitină, rutină Int.Cl: C07D 311/32 G01N 25/14 G01N 21/75 EA, CIS (Eapatis): „Количественное определение”, флаваноиды, кверцетин, рутин Int.Cl: C07D 311/32 G01N 25/14 G01N 21/75 SU (nonpublic): „Количественное определение”, флаваноиды, кверцетин, рутин Int.Cl: C07D 311/32 G01N 25/14 G01N 21/75		
IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate		
V. Documente considerate a fi relevante		
Categorie*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	RU 2035460 C1 1995.05.20	1
A	RU 2085203 C1 1997.07.27	1

A, D, C	SU 1507394 A1 1989.09.15	1
* categoriile speciale ale documentelor citate:		
A – document care definește stadiul anterior general	T – document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria pe care se bazează invenția	
X – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul singur	E – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată	
Y – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe documente de aceeași categorie	D – document menționat în descrierea cererii de brevet	
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expoziție sau la orice alte mijloace de divulgare	C – document considerat ca cea mai apropiată soluție	
	& – document, care face parte din aceeași familie de brevete	
P - document publicat înainte de data de depozit, dar după data priorității invocate	L – document citat cu alte scopuri	
Data finalizării documentării	2012-11-06	
Examinator	IUSTIN Viorel	