



MD 2102 G2 2003.02.28

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 2102 (13) G2  
(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: C 07 J 71/00

(12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2001 0329 (22) Data depozit: 2001.10.01	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2003.02.28, BOPI nr. 2/2003
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE GENETICĂ AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD (72) Inventatori: ȘVEȚ Ștefan, MD; CHINTEA Pavel, MD; LUPAȘCU Galina, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE GENETICĂ AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD	

(54) Procedeu de obtinere a tetraozidei [(25R)-5 $\alpha$ -furostan-3 $\beta$ ,22 $\alpha$ , 26-triol]-26-O- $\beta$ -D-glucopiranozidei

(57) Rezumat:

1  
Invenția se referă la chimia bioorganică, în special la un procedeu de obținere a tetraozidei [(25R)-5 $\alpha$ -furostan-3 $\beta$ ,22 $\alpha$ ,26-triol]-26-O- $\beta$ -D-glucopiranozidei, ce manifestă activitate giberelinică.

Procedeul include degresarea semințelor de *Petunia hybrida hort.*, extracția lor cu soluție hidroalcoolică, concentrarea extractului, cromatografierea restului obținut pe coloană cu silicagel, utilizând în calitate de eluent sistemul cloroform-metanol-apă în proporție de 60:30:10...65:35:10, acetilarea fracțiu-

2  
5 nilor de glicozide steroidice cu anhidridă acetică în piridină, cromatografierea derivaților obținuți pe coloană cu silicagel impregnat cu soluție apoasă de 15% AgNO<sub>3</sub> în sistemul eluenților de cloroform-  
10 etanol în proporție de 3:1...45:40 și saponificarea peracetatului separat cu izolarea ulterioară a produsului finit.

Revendicări: 1

15

MD 2102 G2 2003.02.28

## MD 2102 G2 2003.02.28

3

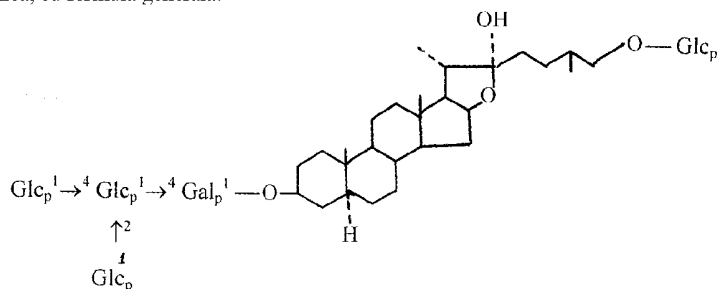
### Descriere:

Invenția se referă la chimia bioorganică, în special la un procedeu de obținere a tetraozidei [(25R)-5 $\alpha$ -furostan-3 $\beta$ ,22 $\alpha$ ,26-triol]-26-O- $\beta$ -D-glucopiranozidei (compusul 1), ce manifestă activitate giberelinică.

5 Este cunoscut procedeu de obținere a tetraozidei [(25R)-furost-5-en-3 $\beta$ ,22 $\alpha$ ,26-triol]-26-O- $\beta$ -D-glucopiranozidei care constă în degresarea semințelor de ceapă cu eter dietilic, extracția acestora cu metanol apos de 70%, concentrarea extractului metanolic până la rest apos și cromatografierea pe coloană cu sefadex G-50, utilizând în calitate de eluent apă distilată [1].

10 Este cunoscut, de asemenea, procedeu de obținere a tetraozidei [(25R)-5 $\alpha$ -furost-5-3 $\beta$ ,22 $\alpha$ ,26-triol]-26-O- $\beta$ -D-glucopiranozidei care constă în degresarea semințelor de vinete, extracția acestora cu soluție de 70% de metanol apos, concentrarea extractului metanolic până la rest uscat, cromatografierea pe coloană cu silicagel cu obținerea unei fracțiuni cromatografice individuale ce conține două glicozide asemănătoare după structură, acetilarea glicozidelor fracțiunii, epoxidarea uneia din glicozide, separarea derivaților obținuți prin cromatografiere pe silicagel, saponificarea peracetatului tetraozidei cu obținerea ulterioară a produsului finit [2]. Dezavantajele acestor procedee constau în imposibilitatea obținerii compusului 1, ce manifestă activitate giberelinică.

15 Problema invenției constă în elaborarea unui procedeu de obținere a unei glicozide steroidice naturale noi – tetraozidei [(25R)-5 $\alpha$ -furostan-3 $\beta$ ,22 $\alpha$ ,26-triol]-26-O- $\beta$ -D-glucopiranozidei ce manifestă activitate giberelinică, cu formula generală:



20 în care Glc<sub>p</sub> - glucopiranoză, Gal<sub>p</sub> - galactopiranoză.

Problema pusă se realizează prin aceea că două glicozide similare după structură, ce se deosebesc doar după structura agliconului în fracțiunea cromatografic individuală, se separă în compuși individuali cu ajutorul silicagelului impregnat cu soluție de 15% de AgNO<sub>3</sub>, datorită cărui fapt glicozidele, agliconii cărora conțin diferite grupe funcționale, au o mobilitate cromatografică diferită pe sorbentul dat.

25 Noutatea invenției constă în faptul că se propune un nou procedeu de obținere a unei noi glicozide steroidice naturale, și anume utilizarea soluției de 15% de AgNO<sub>3</sub> pe silicagel pentru separarea glicozidelor asemănătoare după structură în fracțiunea cromatografic individuală.

30 Acest procedeu include degresarea semințelor de *Petunia hybrida hort.*, extragerea lor cu soluție de 70% de etanol, concentrarea extractului, cromatografierea pe coloană cu silicagel utilizând în calitate de eluent sistemul cloroform-metanol-apă în proporție de 60:30:10...65:35:10 până la obținerea fracțiunii cromatografic individuale ce conține două glicozide steroidice asemănătoare după structură, din șirul furostanului, acetilarea glicozidelor din fracțiune cu anhidridă acetică în piridină, separarea peracetaților obținuți în glicozide individuale pe coloană cu silicagel impregnată cu soluție apoasă de 15% de AgNO<sub>3</sub> în sistemul eluenților de cloroform-etanol în proporție de 3:1...45:40, saponificarea peracetatului tetraozidei cu obținerea în continuare a produsului finit.

35 Rezultatul invenției constă în elaborarea unui nou procedeu de obținere a unei noi glicozide steroidice naturale, ce manifestă activitate giberelinică.

40 *Exemplu.* 1 kg de semințe hibride de *Petunia hybrida hort.*, uscate în aer liber se degresează în cloroform (3 x 3 l), apoi se extrag complet cu alcool etilic de 70% (4 x 3 l). Extractul obținut se concentrează în vacuum până la o remanentă siropoasă, care se dizolvă în 50 ml de metanol, apoi glicozidele steroidice se precipită din soluție cu 300 ml de acetonă. Precipitatul se filtrează și se usucă. Se obțin 29 g de praful ce reprezintă masa glicozidelor și care constituie 2,9% din materia primă inițială.

45 O cantitate de 15 g de rest uscat se pune pe coloana cu silicagel L 100 x 250 mm și se eluează cu un sistem de eluenți cloroform-metanol-apă în proporție de 60:30:10 și apoi de 65:35:10. Controlul separării se efectuează prin cromatografiere subțire pe plăci cu silicagel "Silufol" în aceleași sisteme. În rezultatul cromatografierii se izolează o fracțiune de glicozide cromatografic individuale (2,6 g), care

## MD 2102 G2 2003.02.28

4

produce o reacție pozitivă cu reactivele Sanie și Ehrlich. Aceasta ne permite să constatăm că compușii obținuți sunt glicozide steroidice din șirul furostanului.

În urma hidrolizei acide complete a glicozidelor fracțiunile au fost identificate prin metode fizico-chimice (CSS, CCL, RNM  $^{13}\text{C}$ , IR), utilizând în calitate de agliconi tigogenina și hitogenina, dar ținând  
5 cont de natura furostanolică a glicozidelor, agliconii lor nativi sunt (25R)-5 $\alpha$ -furostan-3 $\beta$ ,22 $\alpha$ ,26-triol și (25R)-5 $\alpha$ -furostan-2 $\alpha$ -3 $\beta$ ,22 $\alpha$ ,26-tetraol.

Pornind de la datele obținute, am concluzionat că fracțiunea reprezintă un amestec din două  
10 componente greu separabile, similare după structură glicozidelor, fapt care a fost confirmat prin analiza RNM  $^{13}\text{C}$ , în care sunt prezente semnalele ce indică că componenta glucidică a fracțiunii glicozidice este identică, iar în partea steroidică a spectrului sunt prezente semnale caracteristice agliconilor (25R)-5 $\alpha$ -furostan-3 $\beta$ ,22 $\alpha$ ,26-triol și (25R)-5 $\alpha$ -furostan-2 $\alpha$ -3 $\beta$ ,22 $\alpha$ ,26-tetraol [Agraval P.K., Join D.C., Gupta R.K. Carbon 13-NMR spectroscopy of Steroidal saponigenin and Steroidal saponin. Phytochemistry, 1985, 24, p. 2479].

Pentru separarea acestui amestec glicozidele fracțiunii sunt acetilate cu anhidridă acetică (50 ml) în  
15 piridină (30 ml), apoi derivații obținuți sunt puși pe coloana (l = 70 cm, d = 1,3 cm) cu silicagel, impregnată cu soluție de 15% AgNO $_3$  și cromatografiați în sistemul cloroform-etanol în raporturile 3:1...45:40 (L 40/100 mm). Peracetatul tetraozidei (25R)-5 $\alpha$ -furostan-3 $\beta$ ,22 $\alpha$ ,26-triolului izolat a fost saponificat cu 50 ml de soluție de 10% NaOH în metanol, timp de 6 ore, la temperatura de 90°C, obținându-se 0,67 g de glicozidă individuală (compusul 1). Compusul 1 reprezintă un praf de culoare  
20 albă cu temperatura de topire de 179...180°C,  $[\alpha]_D^{20}$ -69° (C1,0; H $_2$ O) și formula brută C $_{57}$ H $_{96}$ O $_{26}$ , este bine solubil în apă, etanol, metanol, piridină, insolubil în eter dietilic, acetonă, cloroform. În spectrul IF sunt prezente fâșiile de absorbție de 3400 cm $^{-1}$  (grupa OH) și 900 cm $^{-1}$  (fâșia lată, caracteristică glicozidelor steroidice din șirul furostanului).

Substanța nu este higroscopică, este rezistentă la păstrare în flacoane de sticlă.  
25 Structura compusului 1 este demonstrată prin metodele hidrolizei acide complete și parțiale, a scindării fermentative, oxidării periodate, metilării și metanolizei derivatului permetilat și cercetării produselor obținute cu ajutorul cromatografierii pe hârtie, CSS, cromatografierii gaz-lichide, spectroscopiei IF, RMN  $^{13}\text{C}$  și RMN $^1\text{H}$ , mass-spectroscopiei.

Ca rezultat al hidrolizei acide complete cu 10 ml de 2,5% H $_2$ SO $_4$  la temperatura de 100°C timp de 8  
30 ore, tetraozida se izolează în calitate de aglicon al tigogeninei cu temperatura de topire de 202...203°C,  $[\alpha]_D^{20}$ -65°(C1,0;CHCl $_3$ ),  $[M]^{-1}$ 416. Spectrul IF este 3400, 980, 915, 890, 860 cm $^{-1}$ . În urma cromatografiei pe hârtie și cromatografiei gaz-lichide a acetatilor derivaților aldonitrici ai zaharurilor au fost identificate glucoza și galactoza în raportul 4:1. Ordinul legăturii și dimensiunea ciclurilor  
35 oxidice ale monozaharidelor se determină prin metilarea compusului 1, cu metanoliza ulterioară a permetilatului obținut. Prin metodele cromatografiei în strat subțire și cromatografiei gaz-lichide se identifică cu martori următoarele glicozide metilice: Me-2,3,4,6-tetra-0-Me-D-Glc $_p$ , Me-2,3,6-tri-0-me-D-Gal $_p$  și Me-4,6-di-0-Me-D-Glc $_p$ . La oxidarea periodată cu NaIO $_4$  a glicozidei în partea oligozaharidică a fost identificată glucoza. Succesiunea legaturilor monozaharidelor în lanțul glucidic al glicozidei a fost determinată prin hidroliză acidă parțială (1% H $_2$ SO $_4$  în metanol, timp de 90 min la  
40 temperatura de 80°C). Structura compusului 1 a fost confirmată de asemenea prin analiza spectrelor RMN  $^{13}\text{C}$  și RMN $^1\text{H}$ .

Determinarea activității biologice a tetraozidei [(25R)-5 $\alpha$ -furostan-3 $\beta$ ,22 $\alpha$ ,26-triol]-26-O- $\beta$ -D-glucopiranozidei se efectuează în felul următor.

Semințele de in (soiul C-100) se sterilizează în soluție slabă de KMnO $_4$  timp de 20 min, se clătesc  
45 cu apă distilată și se plasează în vase Petri pe mediu ce conține 0,7% agar (martor). În calitate de etalon servesc acidul gibberelinic A $_3$ (0,2 mg/l) și acidul indolilacetic AIA (0,02 mg/l) care se suplimentează la mediul cu agar. Prin același procedeu se testează și compusul 1 în concentrațiile 1,00; 0,20 și 0,02 mg/l. Vasele se mențin la lumină timp de 7 zile, la temperatura de 22...24°C. După expirarea termenului de creștere se măsoară lungimea rădăcinișilor și tulpinișei. Acțiunea gibberelinică se manifestă prin  
50 alungirea plantulelor, iar cea auxinică – prin reprimarea creșterii rădăcinișilor (Методические рекомендации по проведению скрининга синтетических регуляторов роста растений. Черкассы, 1985, c.18-19). În fiecare variantă au fost testate câte 40 de plantule. Rezultatele au fost exprimate în medii aritmetice și eroarea acestora ( $\bar{x} \pm m_x$ ), procent față de martor. Datele obținute sunt prezentate în următorul tabel:

## MD 2102 G2 2003.02.28

5

Tabel

Date comparative ale acțiunii compusului 1 și a unor substanțe biologice active tradiționale asupra creșterii plantulelor de in (soiul C-100)

Varianta	Concentrația, mg/l	Lungimea tulpinițelor, cm		Lungimea rădăcinițelor, cm	
		$x \pm m_x$	% față de martor	$x \pm m_x$	% față de martor
Martor	-	4,6±0,1	100,0	3,2±0,1	100,0
acidul giberelinic, A <sub>3</sub>	0,20	6,6±0,1*	144,5	3,4±0,1	105,6
acidul indolilacetic, AIA	0,02	4,9±0,1*	106,1	2,6±0,1*	80,7
compusul 1	1,00	7,5±0,1*	164,4	2,8±0,1*	88,8
"-"	0,20	8,1±0,1*	176,4	3,0±0,1*	93,5
"-"	0,02	5,2±0,1*	112,9	3,4±0,1*	105,6

5      \*- deosebiri autentice de martor la nivelul de 5%

Conform datelor prezentate, giberelina A<sub>3</sub> a stimulat creșterea tulpinițelor cu 44,5%, iar AIA a reprimat creșterea rădăcinițelor de in cu 19,3%. Compusul 1 a manifestat însușiri giberelinice evidente în concentrațiile 0,20 și 1,00 mg/l, stimulând creșterea tulpinițelor de in cu 76,4 și 64,4%, corespunzător. Înșușirile auxinice ale compusului 1 au fost mai puțin pronunțate.

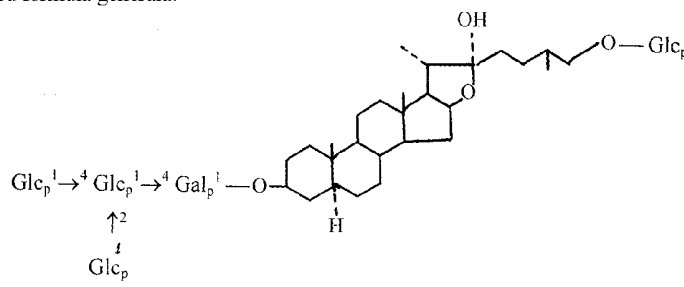
10

Deci tetraozida (compusul 1) obținută manifestă vădită acțiune giberelinică și poate fi utilizată în agricultură în calitate de regulator de creștere.

15

### (57) Revendicare:

Procedeu de obținere a tetraozidei [(25R)-5 $\alpha$ -furostan-3 $\beta$ ,22 $\alpha$ ,26-triol]-26-O- $\beta$ -D-glucopiranozidei cu formula generală:



20

în care Glc<sub>p</sub> este glucopiranoză, Gal<sub>p</sub> – galactopiranoză, ce include degresarea semințelor, extracția lor cu soluție hidroalcoolică, concentrarea extractului, cromatografierea restului obținut pe coloană cu silicagel, utilizând în calitate de eluent sistemul cloroform-metanol-apă în proporție de 60:30:10...65:35:10, acetilarea fracțiunilor de glicozide steroidice cu anhidridă acetică în piridină, cromatografierea derivaților obținuți pe coloană cu silicagel în sistemul eluenților de cloroform-etanol în proporție de 3:1...45:40 și saponificarea peracetatului separat cu izolarea ulterioară a produsului finit, **caracterizat prin aceea că** în calitate de semințe se utilizează semințe de *Petunia hybrida hort.*, iar cromatografierea derivaților obținuți după acetilarea fracțiunilor de glicozide steroidice se efectuează pe coloană cu silicagel impregnat cu soluție apoasă de 15% AgNO<sub>3</sub>.

30

### (56) Referințe bibliografice:

1. SU 1473315
2. SU 1243189

**Șef Secție:**

GUȘAN Ala

**Examinator:**

BAZARENCO Tatiana

**Redactor:**

LOZOVANU Maria

## RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2001 0329		
(22) Data depozit: 2001.10.01		
(51) <sup>7</sup> : C 07 J 71/00 Alți indici de clasificare: <b>Titlul</b> : Procedeu de obținere a tetraozidei [(25R)-5 $\alpha$ furostan-3 $\beta$ , 22 $\alpha$ , 26-triolului]-26-O- $\beta$ -D-glucopiranozidă (71) Solicitantul : INSTITUTUL DE GENETICĂ AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD Termeni caracteristici : compușii furostanolici, obținerea tetraozidelor		
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl. (7))		
(MD, EA, SU) Int. Cl. <sup>7</sup>		
II. Documente considerate ca relevante		
Categoria *	Date de identificare ale documentelor citate și indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	SU1243189	1
A	SU 1473315	1
<input type="checkbox"/> Documentele următoare sunt indicate în continuare a rubricii II		<input type="checkbox"/> Informația referitoare la brevete paralele se anexează
<b>* categoriile speciale ale documentelor consultate:</b>		<b>P</b> - document publicat înainte de data de depozit dar după data priorității invocate
<b>A</b> - document care definește stadiul anterior general		<b>T</b> - 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
<b>E</b> - document anterior dar publicat la data de depozit național reglementar sau după aceasta data		<b>X</b> - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă
<b>L</b> - 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)		<b>Y</b> - 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
<b>O</b> - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere sau orice altă		<b>&amp;</b> - document care face parte din aceeași familie de documente
Data finalizării documentării		2002.11.18
Examinatorul		Bazarenco Tatiana

## RAPORT DE DOCUMENTARE

<b>Informația referitoare la brevete paralele</b>		<b>(21) Nr deposit:</b>	
Date de identificare ale documentelor citate in raport	Data publicării	<b>Brevete paralele</b>	Data publicării
1	2	3	4