



MD 1972 F1 2002.07.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 1972⁽¹³⁾ F1
(51) Int. Cl.⁷: G 01 J 3/12;
C 07 J 71/00

(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. depozit: a 2001 0255 (22) Data depozit: 2001.08.06	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2002.07.31, BOPI nr. 7/2002
(71) Solicitant: INSTITUTUL NAȚIONAL DE FARMACIE, MD (72) Inventatori: VALICA Vladimir, MD; IURASOVA Valentina, MD; FILIPPOV Mihail, MD; CHINTEA Pavel, MD; SPĂNU Constantin, 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 utilizat în chimie și
medicină.

Procedeu solicitat prevede dizolvarea extractului
uscat din semințe de tomate, evaporarea soluției și
uscarea reziduului, adăugarea reactivului Ehrlich,
termostatarea amestecului, adăugarea metanolului,
măsurarea densității optice a soluției obținute și
calcularea concentrației de tomatozidă.

Noutatea invenției constă în aceea că solventul se
separă prin evaporarea soluției și uscarea reziduului

2
la temperatura de 105°C, se utilizează reactivul
Ehrlich care reprezintă soluția de 2% de p-
dimetilaminobenzaldehidă în amestecul CH₃OH :
HCl în proporție de 60:40 corespunzător, iar
termostatarea amestecului se efectuează la tempera-
tura de 40°C în decurs de 40 min.

10
Rezultatul invenției constă în mărirea exactității
și sensibilității procedurii.

Revendicări: 1

15

MD 1972 F1 2002.07.31

Descriere:

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

5 Este cunoscut un procedeu de determinare a glicozidelor furostanolice, de exemplu, din extractul frunzelor dioscoreii, folosind p-aminobenzaldehida (PABA) în mediu acid (reactiv Ehrlich) ce presupune pregătirea în calitate de standard a soluției deltazide în 70% etanol și a extractelor apoase din materie vegetală, 1 ml soluție cercetată se volatilizează “până la capăt”, adăugând la reziduu 0,2 ml reactiv Ehrlich (RE), prezentat în calitate de soluție de 1% p-dimetilaminobenzaldehidă în amestec $\text{CH}_3\text{OH}:\text{HCl}_{\text{conc}}=66:34\%$ vol., termostatarea amestecului reactant la $t=65^\circ\text{C}$ în decurs de 3...5 min, adăugând 3,8 ml metanol și măsurând densitatea optică (D_K) a soluției complexului colorat, după care se calculează concentrația oligofurostanozidelor [1].

10 Dezavantajul procedurii este exactitatea joasă a determinării, explicată prin faptul că la temperatura termostatării egală cu 65°C , paralel cu formarea complexului color decurge procesul hidrolizei acide a glicozidei furostanolice și de asemenea distrucția parțială a complexului format. Totodată intensitatea colorației soluției complexului la început crește, apoi scade în timp, adică este instabilă. Ca rezultat se obține reproducerea joasă a datelor ce influențează exactitatea rezultatelor finale. Mai mult ca atât, componența cunoscută a reactivului Ehrlich nu permite obținerea sensibilității destul de înalte a reacției de formare a complexului tomatozidei cu p-dimetilaminobenzaldehidă, ceea ce de asemenea se răsfrânge asupra exactității rezultatelor.

20 Problema pe care o rezolvă invenția dată constă în creșterea exactității de determinare a concentrației tomatozidei (TMZ) în extractul uscat din semințe de tomate, care a fost numit pacovirină (PCV).

Problema se soluționează prin aceea că procedeu de determinare a concentrației de tomatozidă în preparatul pacovirină presupune pregătirea soluțiilor lor alcoolice sau apoase, evaporarea soluțiilor utilizate și uscarea reziduiului la 105°C ceea ce aduce la mărirea exactității de determinare a concentrației de tomatozidă.

25 Condițiile termostatării amestecului reactant cu reactivul Ehrlich la $t=40^\circ\text{C}$ timp de 40 min asigură stabilitatea colorării soluției fotometrate a complexului format pe o perioadă îndelungată, ce duce la creșterea exactității și siguranței procedurii. Sensibilitatea reacției crește cu 55%.

30 În afară de aceasta, sensibilitatea reacției de formare a complexului tomatozidă cu reactivul Ehrlich conduce la creșterea în el a concentrației HCl. Totodată stabilitatea colorației soluției complexului fotometrat se menține timp îndelungat doar prin mărirea în RE până la 40% vol. HCl_{conc} și micșorarea concentrației metanolului până la 60% vol. Aproape de limită se prezintă și creșterea până la 2% a conținutului PABA în reactivul Ehrlich, care de asemenea influențează asupra exactității și sensibilității procedurii (fig. 2). Creșterea în continuare a concentrației PABA este limitată de solubilitatea lui. Astfel, pentru o sensibilitate satisfăcătoare a reacției date, conținutul optim al reactivului Ehrlich este soluția de 2% PABA în amestec $\text{CH}_3\text{OH}:\text{HCl}_{\text{conc}}=60:40\%$ vol.

Așadar, rezultatul invenției constă în mărirea exactității și sensibilității procedurii.

Exemplu de realizare a invenției

40 Se pregătește soluția alcoolică sau apoasă de pacovirină cu concentrația de 0,5 mg/ml, iar pentru construirea graficului de calibrare se pregătește soluția alcoolică sau apoasă de tomatozidă în limitele concentrației 0,1...1,0 mg/ml. Câte 1 ml soluție de TMZ sau PCV se introduce în eprubetă și se evaporă în soba de uscare la $t=105^\circ\text{C}$. După răcirea până la temperatura camerei la reziduu uscat se adaugă 0,2 ml reactiv Ehrlich, care prezintă o soluție de 2% p-dimetilaminobenzaldehidă în amestec de $\text{CH}_3\text{OH}:\text{HCl}_{\text{conc}}=60:40\%$ vol. Eprubeta cu amestecul reactant se închide cu un dop ermetic și se termostatează la $t=40^\circ\text{C}$ timp de 40 min. Apoi amestecul se răcește, adăugând 3,8 ml alcool metilic.

45 Densitatea optică maximă de absorbție D_K a soluției complexului colorat se înregistrează la spectrometru la $\lambda=518\pm 2$ nm, grosimea stratului de absorbție a cuvelor fiind de 0,5 cm. Pentru calcularea C_{TMZ} în preparatul pacovirină conform D_K se determină coeficientul de proporționalitate al TMZ (K_{TMZ}) și după el se calculează C_{TMZ} . Au fost efectuate cercetări pentru determinarea parametrilor optimi de evaluare a procedurii, în particular s-a determinat temperatura optimă pentru obținerea reziduiului uscat, temperatura și durata termostatării, precum și cel mai eficient în raport cantitativ conținut al reactivului Ehrlich.

55 În calitate de cea mai apropiată soluție a servit procedeu de determinare a glicozidelor furostanolice, în care reziduu uscat a fost obținut prin distilarea laborioasă a soluției, unde reactivul Ehrlich folosit prezintă soluția de 1% p-dimetilaminobenzaldehidă în amestec $\text{CH}_3\text{OH}:\text{HCl}_{\text{conc}}=66:34\%$ vol., termostatarea fiind efectuată la $t=65^\circ\text{C}$, timp de 3...5 min [1].

MD 1972 F1 2002.07.31

4

Datele cercetărilor sunt prezentate în tab. 1, 2 și 3.

Analiza fig. 1 și tab. 1 demonstrează că condițiile optime de termostatare sunt la $t=40^{\circ}\text{C}$ la o durată de 40 min.

- 5 Aceasta asigură o exactitate mai înaltă a analizei rezultatelor în baza obținerii stabilității colorației soluției complexului nou-format pe o perioadă lungă de timp, care ar fi imposibil de obținut la folosirea procedurii standard, deoarece la $t=65^{\circ}\text{C}$ intensitatea colorației soluției scade brusc în timp, iar adaosul cinetic al densității optice D_K trece prin maximum, din cauza accelerării simultane a hidrolizei glicozidei furostanolice și determinării parțiale a complexului nou-format, ceea ce în final se răsfrânge asupra exactității și reproducerii rezultatelor.

10

Tabelul 1

Dependența densității optice (D_K) a soluției complexului colorat de temperatură și durata termostatării lor $C_{\text{OPCV}}=0,5 \text{ mg/ml}$

Timpul (τ , min)	D_K (1 cm)			
	65°C	50°C	40°C	30°C
4	0,92	0,95	0,66	0,22
8	1,00	1,13	0,92	0,43
12	0,95	1,19	1,06	0,59
20	0,67	1,27	1,30	0,91
30	-	1,25	1,42	1,18
40	-	1,23	1,43	1,38
60	-	-	1,43	1,59

- 15 Tabelul 2 demonstrează dependența densității optice D_K a soluției alcoolice a complexului colorat de C_{TMZ} liniară.

Coefficientul de proporționalitate se calculează conform relației:

$$K_{\text{TMZ}} = \frac{D_{\text{TMZ}}}{C_{\text{TMZ}} \cdot l}, \text{ unde}$$

C_{TMZ} - concentrația TMZ (mg/ml),

l - grosimea stratului de absorbție (cm),

20

D_K - densitatea optică a soluției complexului colorat TMZ.

Valoarea medie: $K_{\text{TMZ}}=4,46 \pm 0,06 \text{ ml} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [Зайдель А.Н. Элементарные оценки ошибок измерений, Ленинград, Наука, 1968].

Tabelul 2

Dependența densității optice (D_K) de C_{TMZ} în soluția studiată

Indici	C_{TMZ} (mg/ml)					Valori medii
D_K (0,5 cm)	0,1000	0,2500	0,5000	0,7500	1,0000	$\bar{K}_{\text{TMZ}} = 4,46$
	0,2413	0,5924	1,1249	1,6890	2,1928	$\Delta K_{\text{TMZ}} = 0,04$
	0,2302	0,5884	1,1085	1,6449	2,2662	$S_n = 0,05$
	0,2423	0,5068	1,1168	1,6975	2,2038	$S_n = 0,02$
	0,2128	0,5441	1,0925	1,6902	2,3155	$t_{p,n} = 2,8$
	0,2013	0,5113	1,1019	1,6770	2,2479	$(p = 0,95$ $n = 5)$
$D_{K\text{medie}}$	0,2256	0,5486	1,1089	1,6797	2,2452	$\varepsilon_p = \pm 0,06$
K_{TMZ}	4,5120	4,3888	4,4356	4,4792	4,4904	$\varepsilon_r = 1,3\%$
ΔK_{TMZ}	0,0508	0,0724	0,0256	0,0180	0,0292	

25

Concentrația TMZ în % în preparatul PCV este calculată după formula:

$$C_{\text{TMZ}} = \frac{D_K \cdot 100}{K_{\text{TMZ}} \cdot C_0 \cdot l} = \frac{D_K \cdot 100}{4,46 \cdot C_0 \cdot l} = \frac{22,4 \cdot D}{C_0 \cdot l}, \text{ unde}$$

D_K - densitatea optică în maximumul de absorbție a soluției complexului TMZ în preparatul PCV,

C_0 - concentrația PCV cercetată în soluția de etanol (mg/ml),

l - grosimea stratului absorbant (cm),

30

K_{TMZ} - valoarea medie a coeficientului de proporționalitate $= 4,46 \text{ ml} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Rezultatele determinării concentrației de TMZ (C_{TMZ}) în extractul uscat din semințe de tomate (PCV)

MD 1972 F1 2002.07.31

5

Tabelul 3

Nr. d/o	PCV, mg	C _{OPCV} , mg/ml	D _{K(0,5 cm)}	Conținutul TMZ(X), %	Valori medii
1	12,50	0,50	0,7525	67,42	$\bar{X} = 67,82$ $\Delta \bar{X} = 0,77$ $S_n = 0,96$ $\bar{S}_n = 0,30$ $t_{p,n} = 2,3$ $(p = 0,95; n = 10)$ $\varepsilon_p = \pm 0,70$ $\varepsilon_r = \pm 1,09$
			0,7417	66,46	
2	12,00	0,48	0,7421	69,26	
			0,7327	68,38	
3	13,10	0,52	0,8014	68,52	
			0,7824	66,90	
4	14,00	0,56	0,8625	69,00	
			0,8537	68,30	
5	12,70	0,51	0,7681	67,75	
			0,7624	67,24	

- 5 Tabelul 3 demonstrează că rezultatele determinării conținutului procentual al tomatozidei în pacovirină foarte bine se realizează. Eroarea relativă a cercetărilor $\varepsilon_r = \pm 1,09\%$, adică de 2,5 ori mai joasă comparativ cu procedeul standard [1], unde ea constituie $\pm 2,6\%$.
 Conținutul TMZ în preparatul PCV - $68,0 \pm 0,7\%$.

MD 1972 F1 2002.07.31

6

(57) Revendicare:

5 Procedeu de determinare a concentrației de tomatozidă în extractul uscat din semințe de tomate, care include dizolvarea acestui extract, evaporarea soluției și uscarea reziduului, adăugarea reactivului Ehrlich, termostatarea amestecului, adăugarea metanolului, măsurarea densității optice a soluției obținute și calcularea concentrației de tomatozidă, **caracterizat prin aceea că** evaporarea soluției și uscarea reziduului se efectuează la temperatura de 105°C, se adaugă reactivul Ehrlich care reprezintă soluția de 2% de p-dimetilaminobenzaldehidă în amestecul CH₃OH : HCl în proporție de 60 : 40 corespunzător, iar termostatarea amestecului se efectuează la temperatura de 40°C în decurs de 40 min.

10

(56) Referințe bibliografice:

1. Гуриелидзе К.Г. и др. "Определение фураностаноловых гликозидов в растениях", Прикладная биохимия и микробиология, т. 22, вып. 1, стр. 131-136, "Наука", Москва, 1986

Şef Secție:

CRASNOVA Nadejda

Examinator:

BAZARENCO Tatiana

Redactor:

CANȚER Svetlana

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2001 0255		
(22) Data depozit: 2001.08.06		
(51) ⁷ : C 07 J 75/00, 71/00,; A 61 K 31/00 Alți indici de clasificare: Titlul : Procedeu de determinarea concentrației a glicozidului furostanolic ... în extractul din semințe de tomate (71) Solicitantul : Institutul Național de Farmacie, MD Termeni caracteristici : glucozide furostanolice		
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl. (7))		
Int. Cl. ⁷ C 07 J 75/00, 71/00,; A 61 K 31/00 (MD) 1993- 2001 (EA) 1996-2001		
II. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A MD 645 A MD 670		1 1
☐ 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 depozitului național reglementat dar după data priorității invocate
A - document care definește statutul general al tehnicii		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 evidența 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 data 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 efectuării de documentare		2002.04 08
Examinatorul		Bazarenco Naniana

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