



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2011 00977**

(22) Data de depozit: **29.09.2011**

(41) Data publicării cererii:
30.05.2013 BOPI nr. **5/2013**

(71) Solicitant:
• **CENTRUL DE CERCETARE ȘI
PRELUCRARE PLANTE MEDICINALE
PLANTAVOREL S.A., STR. CUZA VODĂ
NR. 46, PIATRA NEAMȚ, NT, RO**

(72) Inventatori:
• **NECULAE ANTOHE,
PIAȚA M.KOGĂLNICEANU NR. 1, BL. H4,
SC. B, AP. 14, PIATRA NEAMȚ, NT, RO;**
• **IONESCU ELENA, STR. ȘTEFAN CEL
MARE NR. 60, PIATRA-NEAMȚ, NT, RO;**
• **ȚEBRENCU CARMEN ELENA,
BD. DECEBAL NR. 57, BL. B3, SC. C,
AP. 38, PIATRA NEAMȚ, NT, RO;**
• **MIHĂILESCU ROXANA LAURA,
STR. GEORGE COȘBUC NR. 8, BL. A7,
SC. B, ET.2, AP. 29, PIATRA NEAMȚ, NT,
RO;**

• **VERDES RAMONA MIHAELA,
PIAȚA 22 DECEMBRIE NR.3, BL. B2, SC. B,
ET. 1, AP. 25, PIATRA NEMAȚ, NT, RO;**
• **GIURESCU CATRINEL FLORENTINA,
STR. MARATEI NR. 10, BL. S8, AP. 40,
PIATRA NEAMȚ, NT, RO;**
• **MACAVEI ANTONELA,
ALEEA PALTINILOR NR. 3, BL. B2, SC. H,
AP. 127, PIATRA NEAMȚ, NT, RO;**
• **MIERLICI IONELA DACIANA,
STR. IULIAN ANTONESCU, BL. T8, SC. A,
AP. 4, PIATRA NEAMȚ, NT, RO;**
• **CHIRIAC MARIA, STR.TITU MAIORESCU
NR.5, BL.F 37, AP. 70, PIATRA NEAMȚ, NT,
RO**

(54) **METODĂ PERFORMANTĂ, DE DOZARE A ACIDULUI GALIC
ȘI GALOTANINURILOR DIN EXTRACTE VEGETALE ȘI
MATERII PRIME VEGETALE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de dozare a acidului galic și a galotaninurilor. Metoda conform invenției constă din hidroliza acidă, cu hidroxid de sodiu, în prezență de reactant rodamină, a extractului vegetal de coajă de stejar și a materiilor prime vegetale cu conținut în acid galic și galotaninuri, timp de 4 h, într-o microautoclavă

din inox, care permite desfășurarea reacției la o temperatură de 120°C.

Revendicări: 3
Figuri: 1



METODA PERFORMANTA DE DOZARE A ACIDULUI GALIC SI GALOTANINURILOR DIN EXTRACTE VEGETALE SI MATERII PRIME VEGETALE

Autori: Neculae ANTOHE, Roxana MIHAILESCU, Elena IONESCU, Carmen Elena TEBRENCU, Ramona VERDES, Catrinel GIURESCU, Antonela MACAVEI, Ionela MIERLICI, Maria CHIRIAC

DESCRIEREA INVENTIEI

Prezenta inventie se refera la o metoda performanta pentru dozarea acizilor galici si galotaninurilor din extracte vegetale. Metoda a fost obtinuta prin modificarea metodei de dozare a acizilor galici si galotaninuri cu rhodanina elaborata de Inouek H., Hagerman A.G.

Acidul galic este prezent in doua forme in plante:

- sub forma de esteri, dintre care esteri cu masa moleculara mare (pentagaloil glucoza) si care actioneaza ca si taninurile;
- sub forma de acizi liberi.

Datorita importantei, aceasta clasa de compusi organici avand proprietati in special antioxidante, in lume s-au elaborat multe metode de identificare si dozare pentru acesti compusi, unele avand performante mai bune, iar altele mai putin bune in functie de precizie si timpul de realizare a unei analize.

Sunt cunoscute numeroase metode de dozare a acizilor galici si galotaninurilor dintre care citam:

Determinarea fenolilor totali [1] metoda ce se bazeaza pe proprietatile grupelor fenolice ca agenti reductori. La aceasta metoda se poate adauga varianta Folin-Denis si Folin-Ciocalteu.

Metoda cu Vanilina-HCl [2]

Metoda de dozare a galotaninurilor se bazeaza pe hidroliza taninurilor galice si masurarea acidului galic pus in libertate in mediu acid prin reactia cu rhodanina [3] si alte variante.

Determinarea taninurilor hidrolizabile (galice si elagice) dupa reactia cu iodat de potasiu (KIO₃). Taninurile hidrolizabile sub conversie in galat de metil prin metanoliza, iar galatul de metil reactioneaza cu KIO₃ rezultand un cromofor [4]

Metoda cu yterbiu (Reed et.al 1989). Prin aceasta metoda se determina numai taninurile solubile prezente in extractele de planta. Aceasta metoda nu necesita standarde.

Toate aceste metode au multe neajunsuri in sensul ca sunt greoaie, au precizie mica, iar cele mai performante nu pot fi aplicate in mod curent din cauza duratei timpului de analiza, 26 ore cum este in cazul metodei de determinare a acidului galic si galotaninurilor cu rhodanina elaborata de Inouek .H.,Hagerman A.G.

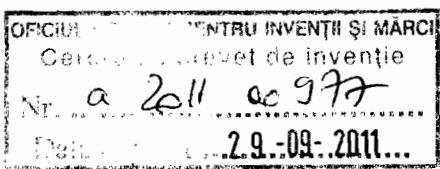
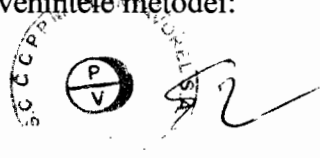
Prezenta inventie inlatura aceste neajunsuri prin aceea ca autorii aduc imbunatatiri substantiale acestei metode reducandu-i timpul de hidroliza de la 26 ore la 4 ore si prin schimbarea unor reactanti.

Astfel in metoda de determinare a galotaninurilor si acidului galic liber s-a utilizat extract obtinut dupa Inouek H. si Hagerman A.G. si se face in modul urmato:

A.HIDROLIZA DUPA INOUEK H. SI HAGERMAN A.G.

1 ml de extract apos rezultat dupa evaporarea acetonei este adus intr-un tub Pyrex, ingustat la mijloc (prezinta o strangulare). Peste extractul apos se adauga 1 ml de H₂SO₄ 4N care prin amestecare cu extractul apos realizeaza un mediu acid H₂SO₄2N. Tubul de Pyrex este introdus intr-o baie de izopropan inghetat si apoi este racordat la o pompa de vid pentru eliminarea totala a aerului. Sub vid, tubul de Pyrex este inchis cu ajutorul unei flacari provenita de la un arzator, dupa care este pus intr-un stativ pentru decongelare. Dupa decongelare tubul de Pyrex este plasat intr-o etuva la 100⁰C timp de 26 ore când hidroliza este considerata terminata.

Inconvenintele metodei:



- timpul de hidroliza este exagerat de mare = 26 ore;
- in unele cazuri exista pericolul de explozie a tuburilor de hidroliza;
- temperatura maxima este de 100⁰C. Ea nu poate fi marita din cauza pericolului de explozie a tuburilor Pyrex.

B. FAZA DE HIDROLIZA DUPA AUTORI

La faza de hidroliza s-a utilizat o microautoclava conceputa de autori si care poate functiona la temperaturi cuprinse intre 30-300°C.

Microautoclava (conform Fig.1 1 – vas de otel; 2 - sistem pentru prinderea in menghina; 3 - sistem de etansare Qukfit jumate de sfera 4 – capac care se insurubeaza pe corpul cilindrului apasând jumatea de sfera pe lacasul tronconic al vasului. 5 – tija pentru vidare si depreseurizare; 6 – stut pentru punerea in legatura cu pompa de vid) este formata dintr-un vas de otel (1) sub forma de cilindru cu o capacitate utila de 25cm³, avand pereti grosi de 10 mm. Partea inferioara a vasului este de forma unui hexagon pentru a putea fi fixata intr-o menghina pentru etansarea microautoclavei. Etansarea vasului la partea superioara se face cu un sistem Qukfit realizat de o structura tranconica aflata in interiorul vasului in partea superioara si o jumate de sfera din inox fixata in lacasul tronconic cu ajutorul unui capac in forma de hexagon (4) care se insurubeaza in capul vasului cu ajutorul unei chei (3).

Capacul sub forma de hexagon si semisfera sunt strabatute de o tija (5) care prin insurubare etanseaza printr-un sistem Qukfit, spatiul de reactie a microautoclavei de mediu inconjurator si care permite atât vidarea cât si depresurizarea microautoclavei si care se face prin intermediul stutului (6) aflat la partea superioara a capacului.

Partea experimentală a fazei de hidroliza

Pentru partea experimentală s-a utilizat un singur extract obtinut identic cu metoda Inouek H., si Hagerman, A.G. cu un continut de acid galic liber (2,28%) si galotaninuri (12,5%). Extractul este lipsit de acetona.

In doua microautoclave au fost introduse câte 10 ml extract. Ambele microautoclave au fost inchise prin strangerea capacului care apasa asupra jumatatii de sfera oferind o etansare perfecta. Stutul (6) a fost pus in legatura cu o pompa de vid, iar prin desurubarea tijei (5) a permis vidarea prin scoaterea oxigenului si a urmelor de acetona. Cu pompa de vid functionand, tija (5) a fost insurubata facandu-se in acest fel o separare perfecta a spatiului de reactie cu mediul inconjurator printr-o etansare perfecta. Ambele probe au fost introduse intr-o etuva fixata la 115⁰ C. Prima proba s-a indepartat din autoclava dupa 4 ore iar a doua dupa 8 ore.

In paralel s-a executat o proba martor utilizand metoda Inouek H. si Hagerman A.G. folosindu-se acelasi extract vegetal.

Toate probele au fost analizate in aceleasi conditii, dupa aceeasi metoda descrisa mai jos.

Determinarea acidului galic liber si a galotaninurilor s-a facut dupa metoda modificata de autori

Metoda utilizata este Spectrofotometrie UV-VIS si impune mai multe etape.

- Trasarea curbei etalon
- Determinarea acidului galic liber
- Determinare galotaninurilor

Trasarea curbei etalon

Reactivi : - acid galic standard, rhodanina (Sigma) 0,667 % g/v; 0,667 g/100 ml metanol, hidroxid de sodiu;

- solutie standard de acid galic (stock) 1 mg/ml. Se cântaresc 100 mg acid galic se dizolva in 80 ml H₂SO₄ 0,2N si se aduce la volumul de 100 ml adaugand H₂SO₄ 0,2N;

- solutia de lucru, de acid galic este formata din (0,1 mg/ml): 1 ml solutie standard + 9 ml apa distilata se completeaza la semn (0,1 mg/ml).

Trasarea curbei s-a realizat conform cu tabelul 1, absorbanta s-a citit la 520nm



Tabelul 1

Acid galic mg	Solutie de lucru μl	Acid sulfuric 0,2N μl	Rhodanina μl	NaOH μl	Apa μl
4	40	160	300	200	4,3
8	80	120	300	200	4,3
12	120	80	300	200	4,3
16	160	40	300	200	4,3
20	200	0	300	200	4,3
Martor	0	200	300	200	4,3

La fiecare solutie si proba martor se adauga 300 μl rhodanina si se asteapta 5 min. Apoi se adauga 200 μl hidroxid de sodiu 0,5N/20g/l. Se asteapta 2,5 min., dupa care se adauga apa distilata 4,3 μl. Dupa 10 min. se citeste absorbanta la 520 nm.

Determinarea acidului galic liber din extract

Se pipeteaza 200 μl din extractul vegetal (inainte de hidroliza) cu continut de acid galic liber si tanin in 4 eprubete. Se indeparteaza acetona din proba de analizat utilizând o sursa de incalzire ajustata la 40°C. Cu ajutorul unui jet de azot apropiat de suprafata lichidului se indeparteaza urmele de acetona in timp de max. 8-10 min.. Se adauga cate 200 μl acid sulfuric 0,2N in cele 4 probe.

In trei dintre ele se adauga 300 μl solutie de rhodanina, iar in a patra proba 300 μl metanol, aceasta din urma va fi folosita ca proba martor.

Dupa 5 min. se adauga 200 μl solutie de Na+0,5N in toate eprubetele. Dupa 2,5 min. se adauga 4,3 μl apa distilata. Dupa 15 min se masoara absorbanta la 520 nm si se compara cu proba martor sau se citeste pe curba etalon.

Determinarea galotaninurilor si acidului galic liber

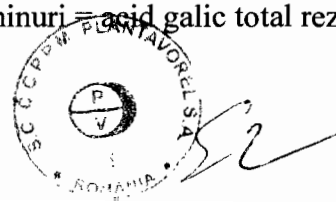
Metoda utilizeaza extract vegetal hidrolizat cu ajutorul microautoclavelor la timp de 4 ore, respectiv 8 ore, la 115°C, precum si o proba martor cu continut de acid galic liber si galotaninuri obtinuta dupa metoda Inouek,H. si Hagerman,A. G. in fiole Pyrex la 100°C timp de 26 ore

Trasarea curbei etalon si analizele extractelor s-a facut prin spectrofotometrie UV-VIS utilizând un aparat Carry 50, utilizand metoda modificata de autori si cea elaborata de Inouek H. si Hagerman A.G. Rezultatele sunt prezentate in tabelul 2

Tabelul 2

Denumire extract	Lungimea de unda nm	Cantitatea de proba luata in lucru mg	Extinctia citata	Dilutia	Acid galic %	Factorul de corelare
Extract de coaja de stejar (solutie hidroalcoolica) inainte de hidroliza	λ =520nm	150,5 mg	Σ=0,2390	150,5mg→25cm ³ 1ml→100	2,28%	5,75
	λ =520nm	150,5 mg	Σ=0,2413	150,5mg→25cm ³ 1ml→100	2,30%	
Extract apos dupa hidroliza conform metodei propuse de autori	λ =520nm	20 mg	Σ=15266	20mg→25cm ³ 1ml→100	12,83%	5,75
Extract apos dupa hidroliza conform metodei INOUEK H. si HAGERMAN A.G. (proba martor)	λ =520nm	35 mg	Σ=15266	20mg→25cm ³ 1ml→100	12,24%	5,75

Galotaninuri = acid galic total rezultat dupa hidroliza – acid galic liber inainte de hidroliza



Formula de calcul utilizata este:

$$\text{g\% acid galic} = \frac{\sum x \cdot f \cdot v}{g} \times 100$$

Σ = extinctia

f = factorul

v = dilutiile

g = grame/mg proba luata in lucru



REVEDICARI

1. Metoda performanta de dozare a acidului galic si galotaninurilor caracterizat prin aceea ca timpul de hidroliza a fost scurtat de la 26 ore la 4 ore prin utilizarea unor microautoclave de constructie speciala (fig.1) creand posibilitatea de a utiliza temperaturi ridicate in reactia de hidroliza de la 30° C la 300°C si in felul acesta timpul de reactie se scurteaza fara a exista pericol de explozie.
2. Metoda performanta de dozare a acidului galic si galotaninurilor conform revendicarii 1, caracterizate prin aceea ca reactivul KOH a fost inlocuit cu reactivul NaOH de fapt singurul care creeaza coloratia pentru citirea extinctiei.
3. Metoda performanta de dozare a acidului galic si galotaninurilor conform revendicarii 1,2, caracterizat prin aceea ca metoda poate fi utilizata ca metoda curenta in laboratoarele de control analitic fiind una dintre cele mai precise.



DESEN EXPLICATIV

