



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2010 01154**

(22) Data de depozit: **23/11/2010**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/03/2016** BOPI nr. 3/2016

(41) Data publicării cererii:
30/08/2012 BOPI nr. 8/2012

(73) Titular:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
ȘTIINȚE BIOLOGICE,
SPLAȘUL INDEPENDENȚEI NR. 296,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **COVACI OVIDIU-ILIE,
STR.DIMITRIE LEONIDA NR.92, BL.G 7,
SC. D, AP.66, PIATRA-NEAMȚ, NT, RO;**
• **BUCUR BOGDAN, STR.BAIA MARE NR.4,
BL.5, SC.A, AP.32, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **BUCUR MĂDĂLINA- PETRUȚA,
STR.CPT.ION BECLEANU NR.16, BL.C 7,
SC.A, AP.8, CÂMPULUNG, AG, RO;**
• **RADU GABRIEL- LUCIAN,
ALEEA ROTUNDĂ NR.4, BL.H 6, SC.D,
AP.61, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
"PROCEDURE FOR THE DETERMINATION
OF ACROLEIN AND OTHER VOLATILE
ORGANIC COMPOUNDS (VOCs) IN AIR
COLLECTED IN CANISTERS AND
ANALYZED BY GAS
CHROMATOGRAPHY/MASS
SPECTROMETRY (GC/MS) USING
SELECTIVE ION MONITORING (SIM)",
OFICIUL DE STANDARDE ȘI
PLANIFICARE A CALITĂȚII AERULUI,
AGENȚIA DE PROTECȚIE A MEDIULUI DIN
SUA, CONTRACT EPA NR. 68-D-00-264,
2006;
R. GOMES, M. E. MEEK, M. EGGLETON,
"ACROLEIN", CONCISE INTERNATIONAL
CHEMICAL ASSESSMENT DOCUMENT 43,
GENEVA, 2002

(54) **METODĂ PENTRU DETERMINAREA RAPIDĂ A ACROLEINEI**



RO 127776 B1

1 Invenția se referă la o metodă de analiză rapidă și selectivă a acroleinei din probe de
mediu și alimente.

3 Metoda se bazează pe faptul că acroleina reacționează cu compușii tiolici și astfel
denaturează alcool dehidrogenaza ce are cisteina în situl activ. Pentru creșterea încrederii
5 în rezultatul analizei, proba este analizată de două ori: direct, pentru cuantificarea acroleinei
împreună cu eventualii interferenți, și pretratată cu cisteină, pentru studiul interferențelor. În
7 proba pretratată, cisteina reacționează cu acroleina și apoi are loc măsurarea inhibiției alcool
dehidrogenazei. Dacă în proba tratată se observă reducerea procentului de inhibiție, atunci
9 proba conține acroleină, iar dacă proba tratată inhibă în continuare alcool dehidrogenaza,
înseamnă că în matricea probei de analizat se găsește un interferent care poate denatura
11 proteinele.

13 Importanța analizei acroleinei: acroleina (propenal) este un compus poluant care
poate fi găsit în fumul provenit de la țigări, combustibili fosili, motoare diesel sau incendii de
pădure. Este un reactiv toxic, utilizat la sinteza acidului acrilic și a DL-metioninei, un amino-
15 acid folosit ca supliment alimentar pentru îmbunătățirea calității furajelor. Acroleina este
folosită în concentrații relativ mari ca biocid acvatic în canalele de irigație, turnuri industriale
17 de răcire și lacuri de tratare a apelor, dar au fost constatate efecte negative la recoltele
irigate cu apă tratată cu acroleină, sau în mediul înconjurător, în apropierea locurilor de
19 deversare. Acroleina poate fi produsă în alimente, prin degradarea termică a uleiului de prăjit
sau prepararea la temperaturi mari a grăsimilor, aminoacizilor sau carbohidraților.

21 Sunt cunoscute metode de analiză a acroleinei din probe complexe, folosind tehnici
bazate pe separări cromatografice sau electroforetice, dar acestea presupun un echipament
23 complex, etape suplimentare de pretratare a probelor și un timp de analiză îndelungat. Au
fost, de asemenea, raportate metode spectrometrice sau electrochimice de analiză a acro-
25 leinei, dar acestea nu sunt selective deoarece se bazează pe proprietăți generale ale aldehi-
delor [*Procedure for the Determination of Acrolein and other Volatile Organic*
27 *Compounds (VOCs) In Air Collected In Canisters and Analyzed By Gas*
Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS) Using Selective Ion Monitoring (SIM),
29 Oficiul de Standarde și Planificare a calității aerului, Agenția de Protecție a Mediului
din SUA, contract EPA Nr. 68-D-00-264, noiembrie 2006], în care este prezentată metoda
de determinare a acroleinei în aer, gaze de evacuare, soluție apoasă, apă de ploaie, probe
31 biologice și lichide, și a deșeurilor solide revizuite (IARC, 1995).

33 [*Concise International Chemical Assessment Document 43*, R. Gomes and M.E.
Meek, Existing Substances Division, Bureau of Chemical Hazards, Health Canada,
35 Ottawa, Canada, and M. Eggleton, Environment Canada, Hull, Quebec, Geneva 2002]
prezintă o metodologie pentru a analiza probele de aer toxic în recipient, introduse într-un
37 sistem cromatograf de gaze/spectrometrie de masă (GC/MS), folosind modul ion selectat
(SIM) și un preconcentrator/autosampler. Această metodă de analiză poate fi utilizată pentru
39 a cuantifica multe COV, inclusiv acroleina, cu puncte de fierbere mai mici de 200°C.

41 Problema pe care o rezolvă invenția constă în determinarea rapidă a prezenței acro-
leinei în probe de mediu și în alimente.

43 Metoda de determinare rapidă a acroleinei, conform invenției, înlătură dezavantajele
de mai sus prin aceea că aceasta cuprinde:

45 - efectuarea a două măsurători spectrometrice la $\lambda = 340$ nm a inhibiției alcool dehi-
drogenazei produsă de o probă supusă analizei în prezența și, respectiv, în absența cisteinei
1M;

47 - compararea diferenței dintre aceste măsurători cu o valoare a măsurătorii spectro-
metrice pentru o probă martor fără acroleină.

RO 127776 B1

Metoda de analiză, conform invenției, prezintă următoarele avantaje:	1
- permite identificarea rapidă a probelor contaminate cu acroleină;	
- asigură selectivitatea analizelor;	3
- este simplu de utilizat chiar și de personal mediu calificat;	
- are un preț de cost scăzut;	5
- este portabilă;	
- nu necesită utilizarea unor reactivi toxici;	7
- nu necesită efectuarea unor etape lungi de tratare/extragere/purificare/derivatizare a probei înaintea analizei propriu-zise.	9
Acroleina are o reactivitate crescută, datorită proprietăților electrophile, și reacționează cu grupările tiolice ale proteinelor și, în consecință, enzimele care au cisteină în centrul catalitic sunt inhibate. Această proprietate este specifică acroleinei. Alte aldehide nu inhibă alcool dehidrogenaza, aceasta producându-se în reacția enzimatică de oxidare a alcoolilor diferitelor aldehide.	11
În matricea probelor complexe pot să se afle și diferite substanțe care au un efect denaturant asupra proteinelor. Pentru evitarea interferențelor, mecanismul de detecție este utilizat pentru investigarea cauzei inhibiției alcool dehidrogenazei. Astfel, proba este amestecată cu cisteină și apoi este măsurată inhibiția remanentă. În cazul în care cisteina reduce inhibiția alcool dehidrogenazei, înseamnă că în probă se află acroleină, iar în caz contrar, denaturarea enzimei este cauzată de un interferent. Această posibilitate de a crește selectivitatea măsurătorilor de inhibiție prin consumarea selectivă a analitului este unică în cazul biosenzorilor enzimatici.	13
În matricea probelor complexe pot să se afle și diferite substanțe care au un efect denaturant asupra proteinelor. Pentru evitarea interferențelor, mecanismul de detecție este utilizat pentru investigarea cauzei inhibiției alcool dehidrogenazei. Astfel, proba este amestecată cu cisteină și apoi este măsurată inhibiția remanentă. În cazul în care cisteina reduce inhibiția alcool dehidrogenazei, înseamnă că în probă se află acroleină, iar în caz contrar, denaturarea enzimei este cauzată de un interferent. Această posibilitate de a crește selectivitatea măsurătorilor de inhibiție prin consumarea selectivă a analitului este unică în cazul biosenzorilor enzimatici.	15
Metoda de analiză conform invenției necesită un spectrometru UV și celule de cuarț transparente în acest domeniu al spectrului electromagnetic.	17
Pentru metoda de analiză sunt necesari următorii reactivi: etanol, nicotin adenin dinucleotidă forma oxidată (NAD ⁺), cisteina din care sunt preparate zilnic soluții stoc în apă purificată. Alcool dehidrogenaza din <i>Saccharomyces cerevisiae</i> este dizolvată în tampon fosfat pH = 7,7 și împărțită în alicoturi păstrate la -20°C. Probele sunt tamponate cu TRIS/HCl (0,1 M, pH = 8,8).	19
Metoda de măsurare a activității enzimatică a alcool dehidrogenazei se bazează pe cuantificarea NADH-ului la $\lambda = 340$ nm. Analiza este efectuată în cuve din cuarț cu volumul de 1 mL. Pentru analiză, 800 μ L de probă este amestecată cu 145 μ L tampon TRIS, 10 μ L soluție 0,1 M NAD ⁺ , 40 μ L soluție 0,1 M etanol. După omogenizare în cuvă se adaugă 5 μ L soluție de alcool dehidrogenază cu activitate specifică 22 UI/mL. Amestecul este omogenizat și absorbanta este măsurată timp de 50 s. Pentru studiul interferențelor: se amestecă 800 μ L de probă cu 135 μ L tampon TRIS și 10 μ L soluție 0,1 M cisteină. După 5 min se adaugă 10 μ L soluție 0,1 M NAD ⁺ , 40 μ L soluție 0,1 M etanol și 5 μ L soluție de alcool dehidrogenază cu activitate specifică 22 UI/mL. Viteza reacției enzimatică este exprimată în unități de absorbantă per secundă ($\Delta A/\Delta t$), și se calculează prin interpolarea părții liniare a curbei experimentale A-t. Procentul de inhibiție se calculează ca reducerea activității enzimatică în raport cu o măsurătoare blank fără acroleină.	21
Se prezintă, în continuare un exemplu de realizare a invenției în legătură cu fig. 1 și 2, ce prezintă:	23
- fig. 1, semnalele analitice obținute folosind soluții standard de acroleină și acroleină cu cisteină, în comparație cu un control;	25
- fig. 2, domeniul liniar al curbei de calibrare, folosind soluții standard de acroleină și acroleină cu cisteină.	27
	29
	31
	33
	35
	37
	39
	41
	43
	45
	47

1 Exemplu

Modul de interpretare al rezultatelor analizelor

3 Inițial se efectuează o măsurare a activității enzimatică de control fără acroleină, și
a fost măsurată o variație a absorbantei $\Delta A/\Delta t = 0,002$ U.A./s. Ulterior se investighează efec-
5 tul inhibitor al acroleinei și pentru o soluție de 0,8 mM acroleină, și se obține $\Delta A/\Delta t =$
0,0013 U.A./s, ceea ce corespunde la un procent de inhibiție $Inh(\%) = 35$. Măsurarea
7 variației absorbantei unei soluții care conține 0,8 mM acroleină și 1 mM cisteină se obține
 $\Delta A/\Delta t = 0,0019$ U.A./s, care corespunde unei variații a activității enzimatică de 5%. Aceasta
9 este mai mică decât 10%, care este considerată limita de detecție și astfel se poate conclu-
ziona că în prezența unui exces de cisteină nu are loc o variație semnificativă a activității
11 enzimatică în raport cu un control.

Metoda de analiză conform invenției poate analiza acroleina cu o limită de detecție
13 de 0,2 mM. Curba de calibrare este liniară între 0,2 și 2 mM. Pentru concentrații mai mari de
acroleină se obține un platou. Ecuația curbei de calibrare prezentate în fig. 2 este: Inhibiție
15 $(\%) = 34,05 \cdot \text{Concentrație acroleină (mM)} + 1,07$; $R^2 = 0,9918$ ($n = 5$). Tot în fig. 2 este pre-
zentată și activitatea enzimatică măsurată pentru soluții în care 1 mM cisteină a fost ameste-
17 cată cu diferite concentrații de acroleină. Pentru acest amestec variația relativă a absorbantei
este sub $\pm 10\%$ și astfel este nesemnificativă.

RO 127776 B1

Revendicări

	1
1. Metodă de determinare rapidă a acroleinei, caracterizată prin aceea că aceasta cuprinde:	3
- efectuarea a două măsurători spectrometrice la $\lambda = 340$ nm a inhibiției alcool dehidrogenazei produsă de o probă supusă analizei în prezența și, respectiv, în absența cisteinei 1 M;	5
- compararea diferenței dintre aceste măsurători cu o valoare a măsurătorii spectrometrice pentru o probă martor fără acroleină.	7
2. Metodă conform revendicării 1, caracterizată prin aceea că se determină acroleina cu o concentrație cuprinsă în intervalul 0,2...1 mM.	9
	11

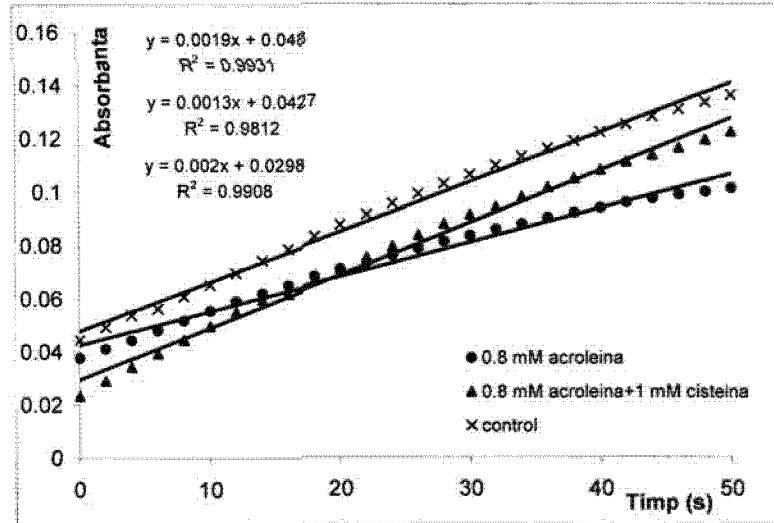


Fig. 1

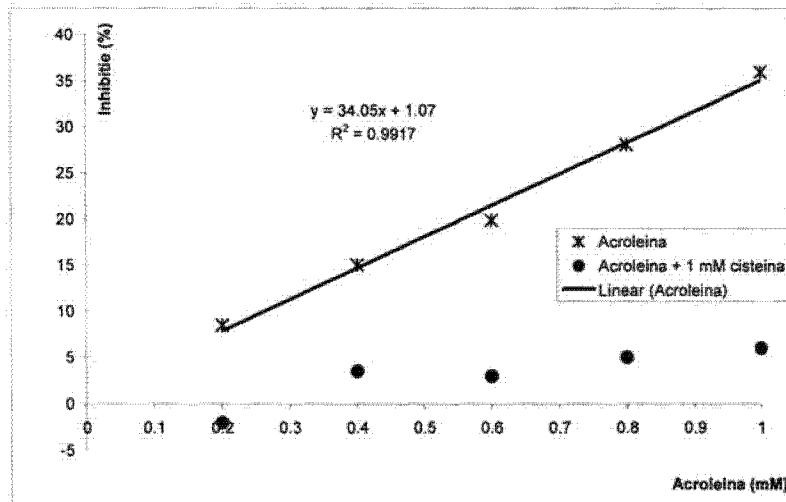


Fig. 2

