



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2016 00153**

(22) Data de depozit: **02/03/2016**

(41) Data publicării cererii:  
**29/09/2017** BOPI nr. **9/2017**

(71) Solicitant:  
• ICDO-INOE 2000 INSTITUTUL DE  
CERCETĂRI PENTRU INSTRUMENTAȚIE  
ANALITICĂ CLUJ-NAPOCA, STR. DONATH  
NR.67, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:  
• KOVACS MELINDA HAYDEE,  
STR.AVRAM IANCU NR. 158, BL.E, AP.5,  
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;

• MICLEAN MIRELA, STR.AVRAM IANCU  
NR. 158, BL.E, AP.5, FLOREȘTI, CJ, RO;  
• ȘENILĂ LĂCRĂMIOARA, STR.BUCIUM  
NR. 1, BL.B1, AP.30, ET.7, CLUJ-NAPOCA,  
CJ, RO;  
• ROMAN CECILIA, STR. PIAȚA ABATOR,  
BL. B, AP. 58, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(54) **METODĂ RAPIDĂ DE DETERMINARE ÎN ULTRAURME  
A COMPUȘILOR DE AROMĂ (TERPENE ȘI TERPENOIDE)  
DIN PROBE DE PLANTE AROMATE, PRIN EXTRAȚIE  
ULTRASONICĂ ȘI GAZ CROMATOGRAFIE CUPLATĂ  
CU SPECTROMETRIE DE MASĂ (USE-GC-MS)**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă analitică de determinare a unor compuși de aromă din probe de plante aromate. Metoda conform invenției constă în extracția cu ultrasunete a probelor de plante aromate cu amestec de solvenți metanol:diclorometan:n-hexan, în raport volumetric de 3:2:1, la temperatura de 30...60°C, timp

de 15...30 min, urmată de evaporarea extractului și determinarea simultană a 22 analiți prin analiza gaz cromatografică cuplată cu spectrometrie de masă.

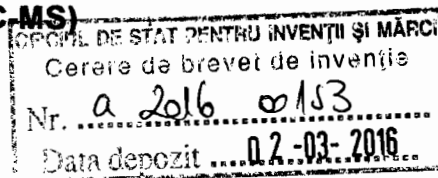
Revendicări: 1



18

**METODĂ RAPIDĂ DE DETERMINARE ÎN ULTRAURME A COMPUȘILOR DE AROMĂ (TERPENE ȘI TERPENOIDE) DIN PROBE DE PLANTE AROMATE PRIN EXTRACȚIE ULTRASONICĂ ȘI GAZ CROMATOGRAFIE CUPLATĂ CU SPECTROMETRIE DE MASĂ (USE-GC-MS)**

**DESCRIERE**



Invenția se referă la o metodă analitică de determinare în ultraurme, rapidă, simplă și sensibilă a 22 compuși de aromă (felandren, terpinen, pinen, acetat de linalil, limonen, eucaliptol, linalol, borneol, isoeugenol, terpinol, metil-eugenol, elemicin, iso-elemicin, camfen, cimen, camfor, verbanona, timol, sabinana, carena, mircena, cariofilen) în probe de plante aromate (ceaiuri, condimente), prin extracție cu ultrasonare, urmată de analiza gaz cromatografică cuplată cu spectrometrie de masă (USE-GC/MS).

Extracția ultrasonică se poate aplica pentru compuși organici nevolatili sau semi-volatili, cum sunt compușii de aroma, din probe solide/vegetale, cum sunt plantele aromate (ceaiuri, condimente).

Compușii de aromă sunt compuși bioactivi care din cauza concentrației uneori extrem de mici, sunt separați și determinați structural cu dificultate. Determinarea calitativă și cantitativă a compușilor de aromă în plantele aromate (ceaiuri, condimente) este un subiect de cercetare modern. Acești compuși se utilizează cu succes atât în alimentație cât și în tratamente și aromaterapie sau parfumerie și produse cosmetice. Sub aspect chimic, compușii de aromă nu sunt compuși unitari ci prezintă amestecuri de zeci sau chiar sute de substanțe organice (aldehide, cetone, alcooli, esteri, etc.) cunoscute sub denumirea de terpene și terpenoide. S-a observat ca plantele aromate au mai mulți compuși principali dintre care unul este caracteristic, compusul de bază, care împreună cu celelate dă aroma caracteristică plantei aromate (ceai, condiment). Identificarea compușilor de aromă din plante aromate precum ceaiuri sau condimente este importantă deoarece separarea și cunoașterea structurii lor chimice constituie pasul esențial atât în explicarea acțiunii lor terapeutice și/sau culinare caracteristice cât și pentru optimizarea proceselor tehnologice din industrii precum cea alimentară, farmaceutică cât și cea cosmetică.

Datorită concentrațiilor extrem de scăzute ale compușilor de aromă (terpene și terpenoide) în probe de plante aromate sunt necesare metode de extracție și determinare foarte sensibile și precise.

**În străinătate** se aplică metode analitice cuplate pentru extracția, detecția și cuantificarea compușilor de aromă (terpene și terpenoide) în probe de plante aromate (ceaiuri, condimente), produse alimentare, produse cosmetice, cum sunt: extracția lichid-lichid (LLE), extracția în fază solidă (SPE), microextracția în fază solidă în headspace (HS-SPME), extracția prin sorbție pe agitator magnetic (SBSE) urmată de determinare prin gaz/lichid cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă (GC-MS, LC-MS) [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7].

**În țară**, s-a realizat și aplicat o metodă de determinare a compușilor de aromă (terpene și terpenoide) din probe de plante aromate prin tehnica microextracție în fază solidă în headspace și gaz cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă (HS-SPME-GC/MS) [8]. După informațiile noastre nu s-a utilizat sau aplicat o metodă analitică pentru determinarea compușilor de aromă (terpene și terpenoide) în probe de plante aromate prin tehnica USE-GC/MS.

Scopul prezentei invenții este elaborarea unei metode analitice de determinare multicomponent a 22 compușilor de aromă (terpene și terpenoide) (felandren, terpinen, pinen, acetat de linalil, limonen, eucaliptol, linalol, borneol, isoeugenol, terpinol, metil-eugenol, elemicin, iso-elemicin, camfen, cimen, camfor, verbanona, timol, sabinana, carena, mircena, cariofilen) în probe de plante aromate (ceaiuri, condimente), prin extracție cu ultrasonare urmată de analiza gaz cromatografică cuplată cu spectrometrie de masă (USE-GC/MS).

Problemele tehnice pe care le rezolvă invenția sunt:

- Reduce timpul de extracție cu 90% față de metodele convenționale (extracția Soxhlet, SDE) durează 10-16 ore;
- Reduce semnificativ cantitatea de solvent utilizat pentru extracție;

Avantajele metodei:

- metoda de extracție USE permite extracția eficientă a compușilor de aromă (terpene și terpenoide) din probe vegetale complexe cum sunt plantațele aromate – ceaiuri, condimente, permite obținerea unor limite de detecție extrem de scăzute, este mai rapidă, mai ieftină și scade consumul de solvenți organici toxici comparativ cu metodele convenționale;

- separarea, identificarea, detecția și cuantificarea analiților se realizează simultan prin GC-MS pe coloană capilară polară, în modul SIM (monitorizarea ionilor selectați), astfel încât metoda analitică propusă de determinare a celor 22 compuși de aromă în probele de plante aromate este economică, rapidă, foarte versatilă, extrem de sensibilă.

Metoda propusă permite determinarea multireziduală a 22 compuși de aroma (felandren, terpinen, pinen, acetat de linalil, limonen, eucaliptol, linalol, borneol, isoeugenol, terpinol, metil-eugenol, elemicin, iso-elemicin, camfen, cimen, camfor, verbanona, timol, sabinana, carena, mircena, cariofilen) în probe de plante aromate (ceaiuri, condimente). Metoda folosită la extracția analiților din probe este ultrasonarea (USE), urmată de separarea analiților pe coloană capilară polară, identificarea și cuantificarea lor prin spectrometrie de masă în modul SIM, pentru creșterea sensibilității metodei.

După recoltare, proba de plantă aromată a fost omogenizată și s-a supus extracției cu ultrasonare. Pentru aceasta, s-a cântărit cu exactitate o masă  $m$  la care s-a adăugat un volum  $V$  de metanol:diclorometan:n-hexan, în raport 3:2:1 (v/v), într-un flacon de sticlă. Flaconul s-a introdus în baia de ultrasonare, menținând nivelul apei deasupra nivelului de solvent din flacon și proba s-a supus extracției ultrasonice timp de 15...30 min, la temperatură de 30...60 °C, la o frecvență și putere de 35 kHz și respectiv 320 W. După sonicare, cele două faze au fost separate iar cel organic a fost filtrat prin hârtie de filtru care conținea o cantitate  $m$  de sulfat de sodiu anhidru ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) pentru reținerea posibilelor molecule de apă. Filtratele obținute s-au reunit într-un flacon sferic și s-au supus evaporării la rotavapor, până la un volum de 1 ml. Analog s-a preparat o probă blank, a reactivilor. Analiza probei s-a efectuat prin GC-MS.

Analiza gaz cromatografică a celor 22 compuși de aromă s-a efectuat prin injectarea a 1  $\mu\text{l}$  din extracatul obținut în inletul gaz cromatografului, în modul „splitless”, menținut izoterm la 260°C. Coloana capilară polară utilizată a fost de tip TR-WAX, 30 m  $\times$  0,32 mm  $\times$  0,25  $\mu\text{m}$ . Gazul purtător He de înaltă puritate, cu un debit de 1 ml/min. Programul aplicat pentru temperatura coloanei în GC a fost următorul: temperatura inițială este de 50 °C, crește până la 160 °C cu o rampă de 5 °C/min; de la 160 la 220 °C cu o rampă de 15 °C/min și menținută la 220 °C pentru 10 minute. Operarea spectrometrului de masă s-a efectuat în modul SIM pentru cei



22 analiți, pentru fiecare din acești alegându-se ionii de identificare și cuantificare specifici.

Metoda USE-GC/MS propusă este eficientă pentru determinarea în ultraurme a 22 compuși de aromă (terpene și terpenoide) în probe de plante aromate (ceaiuri, condimente). Prin această metodă de extracție (USE) se obține o metodă mai eficientă, rapidă și avantajoasă ca și cost în comparație cu metodele de extracție precum LLE sau SDE, scurtând timpul de preparare a probelor, crescând sensibilitatea metodei și reducând volumele de solvenți organici utilizate.

Parametrii de performanță ai metodei de determinare a celor 22 compuși de aromă (terpene și terpenoide) în probe de plante aromate, prin USE-GC/MS sunt:

- limitele de cuantificare pentru cei 22 compuși de aromă (terpene și terpenoide) analiți variază între 0,62–1,95  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ;
- gradele de recuperare pentru cei 22 compuși de aromă (terpene și terpenoide) analiți variază între 92–107 %.

Acesta cerere de brevet a fost realizata cu sprijinul Programului Operațional Sectorial "Creșterea competitivității economice" Axa prioritară II, proiect nr. 1887 INOVA-OPTIMA, cod SMIS-CSNR 49164.

1. Atti-Santos, Ana Cristina, M. Rossato, G. Fernandez Pauletti, Luciana Duarte Rota, J. C. Rech, Marcia Regina Pansera, Fabiana Agostini, Luciana Atti-Serafini, P. Moyna, 2005, Physico-chemical evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil, *Brazilian Archives Biology Technol.*, 48 (6), 1035-1039
2. Bemotiene, G., O. Nivinskiene, R. Butkiene, D. Mockute, 2004, Chemical composition of essential oils of hop (*Humulus lupulus* L.) growing wild in Auskraitija, *Chemija*, 2, 31-36
3. Bicchi, C., Chiara Cordero, Erica Liberto, Barbara Sgorbini, Patrizia Rubiolo, 2008, Headspace sampling of volatile fraction of vegetable matrices, *J. Chromatogr. A*, 1184, 220-233
4. Jorge, Katia, L. C. Trugo, 2003, Discrimination of different hop varieties using headspace gas-chromatographic data, *J. Braz. Chem. Soc.*, 14 (3), 411-415
5. Kovacevic, M., Milica Kac, 2002, Determination and verification of hop varieties by analysis of essential oils, *Food Chem.*, 77, 489-494
6. Lo Presti, Maria, S. Ragusa, Alessandra Trozzi, Paola Dugo, F. Visinoni, Alessia Fazio, G. Dugo, L. Mondello, 2005, A comparison between different techniques for the isolation of rosemary essential oil, *J. Sep. Sci.*, 28, 273-280
7. Oprean, R., M. Tamas, R. Sandulescu, L. Roman, 1998, Essential oils analysis. I. Evaluation of essential oils composition using both GC and MS fingerprint, *J. Pharmaceutical Biomed. Anal.*, 18, 651-657
8. Lazurca, D., 2012, Evaluation of the Phenolic Content in the Buds of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc., *Bulletin of University of Agricultural Science and Veterinary Medicine Cluj-Napoca*, vol. 69, secția Agricultură.

## REVENDICARE

Metodă rapidă de determinare în ultraurme a compușilor de aromă (terpene și terpenoide) din probe de plante aromate (ceaiuri, condimente) prin extracție ultrasonică și gaz cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă **caracterizată prin aceea că** are la bază determinarea a 22 compuși de aromă (felandren, terpinen, pinen, acetat de linalil, limonen, eucaliptol, linalol, borneol, isoeugenol, terpinol, metil-eugenol, elemicin, iso-elemicin, camfen, cimen, camfor, verbanona, timol, sabinana, carena, mircena, cariofilen) în probe de plante aromate, prin tehnica USE-GC/MS, prin extracția cu ultrasunete a probelor cu amestec de solvenți metanol:diclormetan:n-hexan, în raport 3:2:1 (v/v), la temperatura de 30...60 °C, timp de 15...30 min, urmată de evaporarea extractului și determinarea simultană a celor 22 analiți prin gaz cromatografie cuplată cu spectrometri de masă.