



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2020 00809

(22) Data de depozit: 07/12/2020

(41) Data publicării cererii:  
30/06/2022 BOPI nr. 6/2022

(71) Solicitant:  
• INCDO-INOE 2000 INSTITUTUL DE  
CERCETĂRI PENTRU INSTRUMENTAȚIE  
ANALITICĂ ICIA CLUJ-NAPOCA,  
STR.DONATH NR.67, CP 717, OP 5,  
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:  
• KOVACS EMOKE DALMA,  
STR. AL. VLAHUȚĂ, BL. N4, NR. 31, SC. 2,  
AP. 37, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;  
• KOVACS MELINDA HAYDEE,  
STR. AL. VLAHUȚĂ BL. N4, NR. 31, SC. 2,  
AP. 37, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;  
• ROMAN CECILIA, STR.PIAȚA ABATOR,  
BL.B, AP.5, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(54) **METODĂ RAPIDĂ DE DETERMINARE ÎN ULTRAURME PRIN  
EXTRACȚIE ULTRASONICĂ- MICROEXTRACȚIE PE FAZĂ  
SOLIDĂ ȘI GAZ CROMATOGRAFIE CUPLATĂ CU  
SPECTROMETRIE DE MASĂ (USE-SPME-GC-MS) A  
COMPUȘILOR DE CARBOHIDRAȚI DEGRADAȚI  
DIN MATERIA ORGANICĂ A SOLULUI**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă analitică de determinare a compușilor de carbohidrați degradați din materia organică a solului. Metoda, conform invenției, constă în extracția prin ultrasonare timp de 5...30 min la temperatura de 30...80°C cuplată cu tehnica de microextracție pe fază solidă-metoda de extracție și concentrare la temperatura de 35...50°C timp de 5...15 min, urmată de analiza gaz cromatografică cuplată cu spectrometrie de

masă pentru determinarea multireziduală a celor 8 compuși de carbohidrați: arabinoza, galactoza, fructoza, glucoza, lactoza, riboza, xiloza și manoză, cu limite de cuantificare în domeniul 0,02...0,24 nmol xg<sup>-1</sup> și precizie în domeniul 4,5...20,4%.

Revendicări: 1



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MARCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 2020 00809
Data depozit ...07-12-2020...

21

**METODĂ RAPIDĂ DE DETERMINARE ÎN ULTRAURME PRIN EXTRAȚIE  
ULTRASONICĂ-MICROEXTRAȚIE PE FAZĂ SOLIDĂ ȘI GAZ  
CROMATOGRAFIE CUPLATĂ CU SPECTROMETRIE DE MASĂ (USE- SPME-  
GC-MS) A COMPUȘILOR DE CARBOHIDRAȚI DEGRADAȚI DIN MATERIA  
ORGANICA A SOLULUI**

**DESCRIERE**

**Invenția se referă** la o metodă rapidă de determinare în ultraurme prin extracție ultrasonică-microextracție pe fază solidă și gaz cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă (use- spme-gc-ms) a compușilor de carbohidrați degradați din materia organică a solului. Astfel, prezenta metodă permite determinarea următorilor carbohidrați: arabinoză, galactoză, fructoză, glucoză, lactoză, riboză, xiloză și manoză.

Metoda analitică propusă pentru determinarea carbohidraților menționați din probe de sol, are la bază tehnicile de extracție prin ultrasonare cuplată cu tehnica de microextracție pe fază solidă urmată în cele din urmă de analiza gaz cromatografică cuplată cu spectrometrie de masă (USE-SPME-GC/MS).

Extracția ultrasonică este o alternativă ieftină și eficientă care se poate aplica în cazul studiilor asupra matricilor de mediu precum solul și apa, în vederea extracției unor compuși organici nevolatili sau semi-volatili, cum sunt și compușii carbohidrați menționați. Microextracția pe fază solidă, comparativ cu metodele convenționale de extracție, este de asemenea o alternativă rapidă care în schimb nu necesită utilizarea solvenților organici. Această metodă cuplată cu tehnica de extracție ultrasonică are la bază stabilirea unui echilibru al analiților țintă între matricea probei, extractul eșantionului de probă și fibra acoperită cu un polimer specific pe care are loc concentrarea acestora (analiții țintă).

Compușii carbohidrați menționați apar în mediul înconjurător pe cale naturală, ca urmare a unor activități biochimice mediate de cele mai multe ori de microbiota solului. De exemplu, carbohidrații rezultă fie din descompunerea materiei organice de origine vegetală sau animală (descompunere mediată de enzimele extracelulare eliberate de microorganismele din sol), fie sunt eliberați direct (anabolism) în sol de către micro sau macroorganisme vii.

Compușii carbohidrați prezentați sunt considerați importanți datorita rolului lor în ciclul carbonului, unul dintre macronutrienții esențiali care susține biodiversitatea solului. Din punct de vedere chimic, compușii carbohidrați se caracterizează prin structuri chimice stabile și grad de volatilizare scăzut.

Considerând aceste caracteristici ale compușilor carbohidrați prezentați, identificarea lor în probele de sol este importantă deoarece separarea, identificarea și cuantificarea lor constituie pasul esențial în înțelegerea ciclului carbonului în natură.

Datorită concentrațiilor extrem de scăzute cu care compușii de carbohidrați se regăsesc în probele de sol (ordinul  $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ ), precum și caracterului polar și nevolatil (acestea reflectând caracterul lor ionic), sunt necesare metode de extracție, separare și determinare foarte sensibile și precise.

În **străinătate** se aplică metode analitice cuplate (adesea hibride) pentru extracția, detecția și cuantificarea compușilor de carbohidrați în probele de sol, cum sunt: preconcentrare prin criogenare, digestie în mediu acid, separare și analiza cantitativa prin montaje hibride de instrumente analitice precum cromatografia lichida cuplată cu detectori specifici (DAD, corona) sau cu spectrometre cu masă speciale (TOF, MALDI) [1, 2, 3, 4, 5]. Dezavantajul acestor metode este costul ridicat al instrumentelor analitice implicate în sistemele hibride, utilizarea unor acizi foarte toxici în concentrații și cantități ridicate, timpul extins al prelucrării probelor.

În **țară**, identificarea și analiza structurală a compușilor de carbohidrați s-a realizat prin metode spectrofotometrice [6, 7] dar aceste metode au dezavantajul de a avea o sensibilitate grosieră (domeniul  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  sau  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). După informațiile noastre nu s-a utilizat sau aplicat o metodă analitică pentru determinarea compușilor de carbohidrați din probe de mediu precum sol prin tehnica USE-SPME-GC-MS.

**Scopul prezentei invenții** este elaborarea unei metode analitice de determinare multicomponent a 8 carbohidrați (arabinoză, galactoză, fructoză, glucoză, lactoză, riboză, xiloză și manoză) prin extracție prin ultrasonare cuplată cu tehnica de microextracție pe fază solidă urmată în cele din urmă de analiza gaz cromatografică cuplată cu spectrometrie de masă (USE-HS-SPME-GC/MS).

Problemele tehnice pe care le rezolvă invenția sunt:

- Reduce timpul de prelucrare a probelor cu 90 % față de metodele convenționale (digestie, criogenare);

- Reduce semnificativ cantitatea de acizi utilizați în etapa de digestie;
- Permite analiza carbohidraților cu o sensibilitate mult mai ridicată (ordinul  $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ );
- Permite separarea și cuantificarea compușilor de carbohidrați menționați și prin instrumente precum GC-MS fără a necesita utilizarea unor sisteme hibride;

#### Avantajele metodei:

- metoda de extracție USE permite extracția eficientă a compușilor într-un timp mult mai redus și cu un consum mult mai scăzut al substanțelor chimice toxice comparativ cu metodele conventionale;
- aplicarea tehnicii de extracție și preconcentrare prin metoda USE-SPME permite eliminarea utilizării solvenților, scade timpul de preparare a probei și permite obținerea unor grade de recuperare satisfăcătoare (78 – 119 %);
- separarea, identificarea, detecția și cuantificarea analiților se realizează simultan prin GC-MS pe coloană capilară nepolară, în modul SIM (monitorizarea ionilor selectați), astfel încât metoda analitică propusă pentru determinarea celor 8 compuși de carbohidrați din probele de sol este economică, rapidă, foarte versatilă și extrem de sensibilă.

#### **Descrierea metodei propuse prin prezenta cerere de brevet**

Metoda analitică propusă permite determinarea multireziduală a 8 compuși de carbohidrați (arabinoză, galactoză, fructoză, glucoză, lactoză, riboză, xiloză și manoză) din probe de sol. Metoda folosită la extracția și preconcentrarea analiților din probe este ultrasonare cuplată cu tehnica de microextracție pe fază solidă, urmată de separarea analiților pe coloană capilară nepolară, identificarea și cuantificarea lor prin spectrometrie de masă în modul SIM, pentru creșterea sensibilității metodei.

#### **Modul de lucru pentru analiza carbohidraților dintr-o probă de sol**

După prelevare, proba de sol se omogenizează și se supune centrifugării. Pentru aceasta se cântărește cu exactitate o masă  $m$  la care se adaugă un volum  $V$  de buffer de acetat de sodiu – acid acetic cu pH-ul cuprins între 4.2 – 5.2. Acest amestec proba – buffer se expune apoi la o centrifugare cu 4 000 rpm într-un interval de timp cuprins între 5...30 min după care faza lichidă se separă de cea solidă și se

filtrează prin hârtie de filtru. La 30 mL din soluția centrifugată și filtrată se adaugă un volum de n-hexan cuprins între 2 – 20 mL și se supune extracției prin ultrasonare care necesită introducerea acestui amestec în baia de ultrasonare, menținând nivelul apei deasupra nivelului de buffer din flacon. Amestecul buffer – solvent se supune extracției ultrasonice timp de 10...30 min, la temperatura de 30...80 °C, la o frecvență și putere de 35 kHz și respectiv 320 W. După sonicare, faza organică se separă și din aceasta se ia între 0.1...5 mL și se adaugă între 0.1...0.5 mL 2 % (w/v) soluție de NaBH<sub>4</sub> (pentru realizarea procesului de derivatizare) după care acesta se expune unei agitări mecanice timp de 5 min între 225...450 rpm și o incubare la o temperatură cuprinsă între 40...65 °C. Preconcentrarea compușilor de carbohidrați are loc pe o fibra PDMS (cu caracteristicile: polidimetilsiloxan 30 μm) într-un interval de timp cuprins între 5...10 min urmată de desorbția lor la o temperatură cuprinsă între 35...50 °C într-un interval de timp cuprins între 5...15 min. Analiza probei se efectuează prin GC-MS în modul SIM.

Analiza gaz cromatografică a celor 8 compuși de carbohidrați s-a efectuat pe o coloană capilară nepolară de tip TR-5MS, 30 m × 0.32 mm × 0.25 μm. Gazul purtător a fost He de înaltă puritate, cu un debit de 1,2 ml/min. Programul aplicat pentru temperatura coloanei în GC a fost următorul: temperatura inițială este de 80 °C, crește până la 180 °C cu o rampă de 10 °C/min; de la 160 la 230 °C crește cu o rampă de 15 °C/min și menținută la 230 °C pentru 5 minute. Operarea spectrometrului de masă s-a efectuat în modul SIM pentru cei 8 analiți, pentru fiecare din aceștia alegându-se ionii de identificare și cuantificare specifici.

Parametrii de performanță ai metodei de determinare a celor 8 carbohidrați din probe de sol, prin USE-SPME-GC-MS sunt:

- limitele de cuantificare pentru cei 8 carbohidrați variază între 0.02 – 0.24 nmol·g<sup>-1</sup>;
- gradele de recuperare pentru cei 8 carbohidrați variază între 78 – 119 %;
- precizie (repetabilitatea) a fost cuprinsă în domeniul 4.5 – 20.4 %.

Metoda USE-SPME-GC-MS propusă este eficientă pentru determinarea în ultraurme a celor 8 carbohidrați din probe de sol. Prin această metodă de extracție și preconcentrare se obține o metodă mai eficientă, rapidă și avantajoasă din punct de vedere al costului în comparație cu metodele de extracție și preconcentrare precum

digestia acidă și criogenarea, astfel scurtând timpul de preparare a probelor, crescând sensibilitatea metodei și reducând volumele de substanțe chimice utilizate.

**Referințe bibliografice:**

1. Albalasmeh A.A., berhe A.A., Ghezzehei T.A. A new method for rapid determination of carbohydrates and total carbon concentration using UV spectrophotometry. *Carbohydrate Polymers*, 97(2):253-261, 2013.
2. Zhang S., Li C., Zhou G., Che G., You J., Suo Y. Determination of the carbohydrates from *Notopterygium forbesii* Boiss by HPLC with fluorescence detection. *Carbohydrate Polymers*, 97(2):794-799, 2013.
3. Costa M.P., Frasao B.S., Costa Lima B.R.C., Rodrigues B.L., Conte C.A. Simultaneous analysis of carbohydrates and organic acids by HPLC-DAD-RI for monitoring goats's milk yogurts fermentation. *Talanta*, 152:162-170, 2016.
4. Horikawa K., Hiramata T., Shimura H., Jitsuyama Y., Suzuki T. Visualization of soluble carbohydrate distribution in apple fruit flesh utilizing MALDI-TOF MS. *Plant Science*, 278:107-112, 2019.
5. Pasha I., Ahmad F. Monosaccharide composition and carbohydrates linkage identification in cereal brans using UHPLC/QqQ-DMRM-MS. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2020.
6. Chis A., Fetea F., Taoutaou A., Socaciua C. Application of FTIR spectroscopy for a rapid determination of some hydrolytic activity on Sea Buckthorn substrate. *Romanian Biotechnology Letters*, 16(6):5738-5744, 2010.
7. Kovacs E., Scurtu D.A., Senila L., Cadar O., Dumitras D.E., Roman C. Green protocol for the isolation of carbohydrates from vineyard vine-shoot waste. *Analytical Letters*, 2020.

## REVENDICARE

Metodă analitică rapidă, simplă și sensibilă **caracterizată prin aceea că** determină în ultraurme anumiți carbohidrați (arabinoză, galactoză, fructoză, glucoză, lactoză, riboză, xiloză și manoză) din probe de sol aplicând extracția prin ultrasonare timp de 5...30 min la temperatura de 30...80 °C cuplată cu tehnica de microextracție pe fază solidă – metodă de extracție și concentrare cu consum minim de substanțe și timp (desorbția are loc la o temperatură cuprinsă între 35...50 °C într-un interval de timp cuprins între 5...15 min), urmată de analiza gaz cromatografică cuplată cu spectrometrie de masă (USE-SPME-GC/MS) a celor 8 analiți carbohidrați iar metoda propusă reduce timpul de prelucrare a probelor cu 90 % față de metodele convenționale (digestie, criogenare); reduce semnificativ cantitatea de acizi utilizați în etapa de digestie; permite analiza carbohidraților cu o sensibilitate mult mai ridicată (ordinul  $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ ) și permite separarea și cuantificarea compușilor de carbohidrați menționați și prin instrumente precum GC-MS fără a necesita utilizarea unor sisteme hibride.