



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2021 00666

(22) Data de depozit: 08/11/2021

(41) Data publicării cererii:  
30/05/2023 BOPI nr. 5/2023

(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. VLĂHUȚĂ 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  
A PRODUȘILOR REZULTAȚI ÎN URMA ACTIVITĂȚII  
ENZIMELOR GLUCOZIDICE DIN SOL

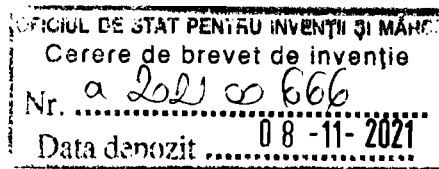
(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă analitică de determinare în ultraurme a opt analiți carbohidrați: arabinoza, galactoza, fructoza, glucoza, lactoza, riboza, xiloza și manoza din sol. Metoda, conform invenției, constă în etapele de extracție prin ultrasonare (USE) și preconcentrare a analiților din probe de sol pe o fibră de polidimetilsiloxan cuplată cu tehnica de microextracție pe faza solidă (SPME), separarea analiților pe coloană

capilară nepolară, identificarea și cuantificarea analiților prin spectrometrie de masă GC-MS în modul SIM, cu următoarele performanțe: limite de cuantificare a celor opt compuși de carbohidrați 0,02...0,24 nmol x g<sup>-1</sup>, cu grade de recuperare satisfăcătoare și cu o precizie în domeniul 4,5...20,4%.

Revendicări: 1





## METODA RAPIDA DE DETERMINARE CANTITATIVA IN ULTRAURME A PRODUSILOR REZULTATI IN URMA ACTIVITATII ENZIMELOR GLUCOZIDICE DIN SOL

### DESCRIERE

**Inventia se refera** la o metoda rapida de determinare cantitativa in ultraurme a produsilor rezultati in urma activitatii enzimelor glucozidice din sol. Cu ajutorul metodei analitice propuse prin prezenta cerere de brevet se poate determina continutul de glucoza (produs principal) si al unor produse secundari (xiloza, manoza, arabinoza, galactoza, fructoza, lactoza, si riboza) din sol, produse rezultati in urma degradarii celulozei si hemicelulozei de catre enzimele extracelulare glucozidice.

Metoda analitica propusa pentru determinarea concentratiei produsilor rezultati in urma activitatii enzimelor glucozidice din sol, are la baza tehnicile de extractie prin ultrasonare cuplata cu tehnica de microextractie pe faza solida urmata in final de analiza gaz-cromatografica cuplata cu spectrometria de masa (USE-SPME-GC/MS).

Extractia ultrasonica reprezinta o alternativa ieftina si eficienta care se poate aplica in cazul studiilor asupra matricilor de mediu precum solul si apa, in vederea extractiei unor compusi organici nevolatili sau semi-volatili, cum sunt si compusii carbohidrati mentionati (glucoza, xiloza, manoza, arabinoza, galactoza, fructoza, lactoza, si riboza). Microextractia pe faza solida, comparativ cu metodele conventionale de extractie, reprezinta o alternativa rapida care in schimb nu necesita utilizarea solventilor organici (n-hexan, petrol eter, acetona, pentan, iso-octan, etc.). Aceasta metoda cuplata cu tehnica de extractie ultrasonica are la baza stabilirea unui echilibru al analitilor tinta intre matricea probei, extractul esantionului de proba si fibra acoperita cu un polimer specific pe care are loc concentrarea analitilor tinta.

Compusii carbohidrati precum glucoza, xiloza, manoza, arabinoza, galactoza, fructoza, lactoza, si riboza apar in mediul inconjurator pe cale naturala, ca urmare a unor activitati biochimice mediate de cele mai multe ori de microbiota solului. De exemplu, carbohidratii rezulta fie din descompunerea materiei organice de origine vegetala sau animala (descompunere mediata de enzimele extracelulare eliberate de microorganismele din sol), fie sunt eliberati direct (anabolism) in sol de catre micro- sau macroorganismele vii [1].

Compusii carbohidrati glucoza, xiloza, manoza, arabinoza, galactoza, fructoza, lactoza, si riboza sunt considerati importanti datorita rolului lor in ciclul carbonului, unul dintre macronutrientii esentiali care sustin biodiversitatea solului. Din punct de vedere chimic, compusii carbohidrati se caracterizeaza prin structuri chimice stabile si grad de volatilizare scazut [2, 3].

Considerând aceste caracteristici ale compusilor carbohidrati glucoza, xiloza, manoza, arabinoza, galactoza, fructoza, lactoza, si riboza, identificarea si determinarea concentratiei lor in probele de sol este importanta deoarece separarea, identificarea si cuantificarea lor constituie pasul esential in intelegerea ciclului carbonului in natura [4].

Datorita concentratiilor extrem de scazute cu care compusii de carbohidrati se gasesc in probele de sol (ordinul  $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ ), precum si caracterului polar si nevolatil (acesta reflectând caracterul lor ionic), sunt necesare metode de extractie, separare si determinare foarte sensibile si precise [5].

In **strainatate** se aplica metode analitice cuplate (adesea hibride) pentru extractia, detectia si cuantificarea compusilor de carbohidrati in probele de sol, cum sunt: preconcentrare prin criogenare, digestie in mediu acid, separare si analiza cantitativa prin montaje hibride de instrumente analitice precum cromatografia lichida cuplata cu detectori specifici (DAD, corona) sau cu spectrometre cu masa speciale (TOF, MALDI) [6, 7, 8]. Dezavantajul acestor metode este costul ridicat al intrumentatiei analitice implicate in sistemele hibride, utilizarea unor acizi foarte toxici in concentratii si cantitati ridicate, timpul extins necesar prelucrării probelor [9, 10].

In **tara**, identificarea si analiza structurala a compusilor carbohidrati de tip glucoza, xiloza, manoza, arabinoza, galactoza, fructoza, lactoza, si riboza s-a realizat prin metode spectrofotometrice [11, 12] dar aceste metode au dezavantajul de a avea o sensibilitate grosiera (domeniul  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  sau  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Dupa informatiile noastre nu s-a utilizat sau aplicat o metoda analitica pentru determinarea compusilor de carbohidrati din probe de sol prin tehnica USE-SPME-GC-MS similara celei care face obiectul prezentei cereri de brevet.

**Scopul prezentei inventii** este dezvoltarea unei metode analitice de determinare multicomponent a opt carbohidrati (arabinoza, galactoza, fructoza, glucoza, lactoza, riboza, xiloza si manoza) prin extractie prin ultrasonare cuplata cu

tehnica de microextractie pe faza solida urmata in final de analiza gaz cromatografica cuplata cu spectrometria de masa (USE-HS-SPME-GC/MS).

**Problemele tehnice pe care le rezolva inventia sunt:**

- reduce timpul de prelucrare a probelor cu 90 % fata de metodele conventionale (digestie, criogenare);
- reduce semnificativ cantitatea de acizi utilizati in etapa de digestie;
- permite analiza carbohidratilor: arabinoza, galactoza, fructoza, glucoza, lactoza, riboza, xiloza si manoza cu o sensibilitate mult mai ridicata (ordinul  $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ );
- permite separarea si cuantificarea carbohidratilor (arabinoza, galactoza, fructoza, glucoza, lactoza, riboza, xiloza si manoza) prin instrumente precum GC-MS fara a necesita utilizarea unor sisteme hibride;

**Avantajele metodei:**

- metoda de extractie USE permite extractia eficienta a compusilor intr-un timp mult mai redus si cu un consum mult mai scazut al substantelor chimice toxice comparativ cu metodele conventionale;
- aplicarea tehnicii de extractie si preconcentrare prin metoda USE-SPME permite eliminarea utilizarii solventilor, scade timpul de preparare al probei si permite obtinerea unor grade de recuperare satisfacatoare (78 – 119 %);
- separarea, identificarea, detectia si cuantificarea analitilor se realizeaza simultan prin GC-MS pe coloana capilara nepolara, in modul SIM (monitorizarea ionilor selectati), astfel incât metoda analitica propusa pentru determinarea celor opt compusi de carbohidrati din probele de sol este economica, rapida, foarte versatila si extrem de sensibila.

**Modul de lucru pentru analiza carbohidratilor dintr-o proba de sol:** Metoda propusa permite determinarea multireziduala a concentratiei a opt compusi de carbohidrati (arabinoza, galactoza, fructoza, glucoza, lactoza, riboza, xiloza si manoza) din probe de sol. Metoda folosita la extractia si preconcentrarea analitilor din probe este ultrasonare cuplata cu tehnica de microextractie pe faza solida, urmata de separarea analitilor pe coloana capilara nepolara, identificarea si cuantificarea lor prin spectrometrie de masa in modul SIM, pentru cresterea sensibilitatii metodei.

Dupa prelevare, proba de sol a fost omogenizata si s-a supus centrifugarii. Pentru aceasta, s-a cântarit cu exactitate o masa  $m$  la care s-a adaugat un volum  $V$

de buffer de acetat de sodiu – acid acetic cu pH-ul cuprins între 4.2...5.2. Acest amestec proba – buffer s-a expus la o centrifugare cu 4 000 rpm într-un interval de timp cuprins între 5...30 min după care faza lichidă a fost separată de cea solidă și a fost filtrat prin hârtie de filtru. La 30 mL din soluția centrifugată și filtrată s-a adăugat un volum de n-hexan cuprins între 2...20 mL și s-a supus extractiei prin ultrasonare care a necesitat introducerea acestui amestec în baia de ultrasonare, menținând nivelul apei deasupra nivelului de buffer din flacon și amestecul buffer – solvent s-a supus extractiei 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 a fost separată și din aceasta s-a luat între 0.1...5 mL și s-a adăugat între 0.1...0.5 mL 2 % (w/v) soluție de NaBH<sub>4</sub> (pentru realizarea procesului de derivatizare) după care acesta a fost expus unei agitări mecanice timp de 5 min la o viteză de 225...450 rpm și o incubare la o temperatură cuprinsă între 40...65 °C. Preconcentrarea compusilor de carbohidrați a avut loc pe o fibră 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 s-a efectuat prin GC-MS în modul SIM.

Analiza gaz-cromatografică a celor opt compusi 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: 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 este menținută la 230 °C pentru 5 minute. Operarea spectrometrului de masă s-a efectuat în modul SIM pentru cei opt analiți, pentru fiecare din aceștia alegându-se ionii de identificare și cuantificare specifici.

Metoda USE-SPME-GC-MS propusă este eficientă pentru determinarea în ultraurme a celor opt carbohidrați din probe de sol. Prin această metodă de extracție și preconcentrare se obține o metodă mai eficientă, rapidă și avantajoasă ca și cost 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.

Parametrii de performanta ai metodei de determinare a celor opt carbohidrati (arabinoza, galactoza, fructoza, glucoza, lactoza, riboza, xiloza si manoza) din probe de sol, prin USE-SPME-GC-MS sunt:

- limitele de cuantificare pentru cei opt carbohidrati variaza intre 0.02 – 0.24 nmol·g<sup>-1</sup>;
- gradele de recuperare pentru cei opt carbohidrati variaza intre 78 – 119%
- precizia (repetabilitatea) este cuprinsa in domeniul 4.5 – 20.4 %;

#### Referinte bibliografice:

1. Pang R., Xu X., Tian Y., Cui X., Ouyang H., Kuzyakov Y. *In-situ* <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> labeling to trace carbon fluxes in plant-soil-microorganism systems: Review and methodological guideline. *Rhizosphere*, 20, 100441, 2021.
2. Bonanomi G., Filipis F., Zotti M., Idbella M., Cesarano G., Al-Rowaily S., Abd-ElGawad A. Repeated applications of organic amendments promote beneficial microbiota, improve soil fertility and increase crop yield. *Applied Soil Ecology*, 156, 103714, 2020.
3. Cau W., Wang Y., Ni H., Liu Z., Liu J., Zhong J., Hou Q., Shan C., Yang Z., Guo Z. Diversity of microbiota, microbial functions, and flavor in different types of low-temperature Daqu. *Food Research International*, 150(partA), 110734, 2021.
4. Zaher H., Sabir M., Benjelloun H., Hounzandji P.I. Effect of forest land use change on carbohydrates, physical soil quality and carbon stocks in Moroccan cedar area. *Journal of Environmental Management*, 254, 109544, 2020.
5. Li X., Xie B., Wu M., Zhao J., Xu Z., Liu L. Visible-to-near-infrared optical properties of protein, lipid and carbohydrate in both solid and solution state at room temperature. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 259, 107410, 2021.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.

## REVEDICARE

Metoda rapida de determinare in ultraurme a produsilor rezultati in urma activitatii enzimelor glucozidice din sol, metoda analitica rapida, simpla si sensibila **caracterizata prin aceea ca** determina in ultraurme carbohidratii arabinoza, galactoza, fructoza, glucoza, lactoza, riboza, xiloza si manoză din probele de sol aplicand extractia prin ultrasonare timp de 5...30 min la temperatura de 30...80 °C cuplata cu tehnica de microextractie pe faza solida – metoda de extractie si concentrare cu consum minim de substante si timp (desorbția are loc la o temperatura cuprinsa intre 35...50 °C intr-un interval de timp cuprins intre 5...15 min), urmata de analiza gaz-cromatografica cuplata cu spectrometrie de masa (USE-SPME-GC/MS) a celor opt analiti carbohidrati cu urmatorii parametri de performanta: limitele de cuantificare variaza intre 0.02 – 0.24 nmol·g<sup>-1</sup>; gradele de recuperare variaza intre 78 – 119 % iar precizia (repetabilitatea) este cuprinsa in domeniul 4.5 – 20.4 %.