



**UNIVERSITATEA BABEŞ-BOLYAI  
FACULTATEA DE FIZICĂ**



## **Rezumatul tezei de doctorat**

# **STUDIUL UNOR SISTEME COMPLEXE CU APLICAȚII BIOMEDICALE ȘI ECOLOGICE**

**Iordache Andreea-Maria**

**Conducător Științific  
Prof. Univ. Dr. Onuc Cozar**

**Cluj-Napoca  
2011**

## Cuprinsul tezei

Introducere .....	7
CAPITOLUL 1 APARATURA ȘI TEHNICA EXPERIMENTALĂ .....	9
1.1 Spectrometria de masă .....	9
1.1.1 Principiile spectrometriei de masă .....	10
1.1.2 Sisteme de introducere .....	12
1.1.3 Surse de ioni (ICP și EI) și tehnici de ionizare .....	14
1.1.4 Analizoare de masă .....	18
1.1.5 Detectia ionilor. Sensibilitatea spectrometrului .....	22
1.1.6 Înregistrarea și achiziția datelor MS. Mod de lucru .....	23
1.1.7 Spectrometrul de masă cu plasmă cuplată inductiv (ICP-MS) .....	24
1.2 Cromatografia de gaze .....	26
1.2.1 Caracteristici de bază ale proceselor cromatografice .....	26
1.2.2 Modelul teoretic al cromatografului de gaze .....	27
1.2.3 Procesul separării cromatografice .....	28
1.3 Cuplajul cromatograf de gaze- spectrometru de masă (GC-MS) .....	32
CAPITOLUL 2 VALIDAREA METODELOR DE ANALIZĂ CANTITATIVĂ.....	37
2.1 Proceduri de preparare a probelor (Sampling) .....	37
2.1.1 Extracția lichid –lichid a compușilor organici (LLE) .....	37
2.1.2 Extracția pe fază solidă .....	38
2.1.2.1 Extracția pe fază solidă (SPE) .....	40
2.1.2.2 Microextracția pe fază solidă (SPME) .....	41
2.1.2.3 Microextracția pe fază solidă din fază gazoasă de deasupra probei –Headspace .....	41
2.1.3 Extracția cu solvent asistată de ultrasunete (USE) .....	41
2.1.4 Extracția cu solvent asistată de microunde (MWE) .....	42
2.2 Parametrii de validare ai metodei .....	43
2.3 Analiza cantitativă de compuși bioactivi prin diluție izotopică. Curba de calibrare. Calcul matricial .....	47
CAPITOLUL 3 DETERMINAREA UNOR PRINCIPII ACTIVE DIN PLANTE .....	53
3.1 Elaborarea și testarea comparativă a principalelor metode de extracție utilizate în analiza principiilor active din plante .....	54
3.2 Caracterizarea unor extracte pentru uz terapeutic prin GC/MS .....	60
3.3 Analiza flavonoizilor din <i>Orthosiphon stamineus</i> Benth prin GC/MS .....	66
3.4 Studiul unor principii active din plante medicinale prin GC-MS .....	70
3.5 Caracterizarea compușilor de aromă a unor uleiuri volatile prin GC-MS .....	78
3.6 Caracterizarea unor nutrienți biologic activi (compuși volatili, acizi grași, aminoacizi, compuși cu acțiune terapeutică) prin GC-MS .....	84
CAPITOLUL 4 ANALIZĂ DE PRECIZIE RIDICATĂ PENTRU CONTROLUL ALIMENTELOR .....	104
4.1 Utilizarea metodelor ICP-MS și GC-MS în controlul alimentelor .....	104
4.1.1 Validarea metodei de determinare multielement la nivel de urme ( $\mu\text{g/L}$ ) din apă potabilă prin tehnica ICP-MS .....	107
4.1.2 Dezvoltarea metodelor de analiză cantitativă la nivel de urme pentru determinarea metalelor și pesticidelor din vinuri .....	112

---

4.1.3 Metodă de autentificare a sucurilor prin GC/MS .....	119
CAPITOLUL 5 ANALIZĂ DE PRECIZIE RIDICATĂ PENTRU DETERMINAREA UNOR POLUANȚI ȘI ALERGENI .....	125
5.1 Metode comparative de extracție pentru determinarea trihalometanilor (THMs) în apă potabilă. Validarea comparativă a metodelor de analiză cantitativă THMs .....	125
5.2 Determinarea de metale toxice din pulberi în suspensie și soluri .....	132
5.3 Studiul unor alergeni din produsele cosmetice .....	142
CAPITOLUL 6 CONCLUZII .....	151
BIBLIOGRAFIE .....	155

## **Cuvinte cheie**

- Cuplaj GC-MS, SIM, diluție izotopică, validare, analiză cantitativă
- principii active, extracte, uleiuri esențiale, plante, flavonoizi
- ICP-MS, seleniu, oligoelemente, aminoacizi, acizi grași, derivatizare
- Adulterare, steroli
- metale grele, material de referință certificat, mineralizare cu microunde
- particule în suspensie, alergeni

## Introducere

Dintre toate tehnicile spectroscopice, *spectrometria de masă* a cunoscut o dezvoltare spectaculoasă, este poate tehnica spectroscopică care oferă cele mai multe posibilități aplicative în domeniul biomedical și al analizei mediului înconjurător [1].

Spectrometria de masă (MS) este o tehnică de investigare cu largi aplicații în fizică, cum ar fi: determinarea maselor atomice și moleculare, compoziția izotopică a elementelor sau identificarea compușilor organici. Pe lângă aceste aplicații, ea a devenit una dintre cele mai importante tehnici de detecție în cromatografie, fiind utilizată atât la identificarea analiților care eluează din coloana cromatografică, cât și la determinarea lor cantitativă [2].

Spectrometria de masă este un instrument adecvat pentru studiul tuturor substanțelor, deoarece dintr-o cantitate infimă se furnizează mai multe informații despre structura și compoziția unei substanțe, decât oricare altă tehnică analitică. Spectrometria de masă poate fi considerată o tehnică de excepție, prin dexteritatea unică de a identifica structuri necunoscute și prin abundența domeniilor în care și-a găsit menirea. Inventarea cromatografului de gaze pentru separarea amestecurilor și în special cuplajul cromatograf de gaze-spectrometru de masă (GC-MS), tehnică modernă de analiză calitativă și cantitativă, sensibilă și selectivă, a condus la un număr mare de aplicații în ultimele decenii [3]. Tehnica de marcarea a compușilor cu izotopi stabili a permis utilizarea trasorilor izotopici și analiza lor a cerut o tehnică capabilă să măsoare concentrații cât mai mici. Tehnica GC-MS permite analiza concentrațiilor de ordinul pg/ml și mai mici. Studiile actuale se axează pe dezvoltarea și optimizarea unor metode de analiză capabile fie să determine compoziția unor probe (amprenta cromatografică/metabolomică), fie să identifice anumiți compuși "markeri" care să ateste calitatea și autenticitatea produsului respectiv. Spectrometria de masă MS, incluzând și cuplajul GC-MS, este cea mai utilizată tehnică în evaluarea amprente metabolomice [4].

Scopul acestei lucrări este dezvoltarea unor metode analitice și optimizarea sistemelor GC-MS (gaz cromatograf cuplat cu spectrometru de masă) și ICP-MS (spectrometru de masă cu plasmă cuplată inductiv) pentru determinarea unor principii active din plantele aromatice și medicinale, elaborarea metodelor de analiză pentru controlul alimentelor și de asemenea determinarea unor poluanți și alergeni din mediul înconjurător.

În primul capitol sunt descrise mai detaliat spectrometria de masă și gaz cromatografia, acestea fiind tehnicile utilizate în analizele efectuate în partea experimentală.

Având în vedere complexitatea compoziției analiților de interes (zeci sau chiar sute de compuși), în capitolul 2 sunt descrise metodele de extracție utilizate în cercetările noastre și validarea metodelor de analiză cantitative.

Aromele și substanțele odorante sunt compuși bioactivi care din cauza concentrațiilor uneori extrem de mici, sunt separați și determinați structural cu dificultate, pas esențial în aplicarea acțiunii lor terapeutice caracteristice. Capitolul 3 prezintă aplicații ale metodei GC-MS în determinarea compușilor organici cu rol bioactiv din extractele de plante (mușețel, mentă, roinită, cătină, trandafir, busuioc, vermut, biter, floratonic, *Orthosiphon stamineus* Benth) utilizate în scop terapeutic.

Capitolul 4 cuprinde analize de precizie ridicată în controlul alimentelor (apă și vinuri) și verificarea autenticității sucurilor utilizând biomarkeri specifici prin cele două tehnici amintite mai sus.

Capitolul 5 prezintă analize de precizie ridicată pentru determinarea unor poluanți din mediul înconjurător (metale toxice, THMs) și alergeni studiați în produse cosmetice sau parfumerie.

Ultimul capitol sintetizează concluziile desprise în urma rezultatelor obținute experimental.

## 1. Aparatura și tehnica experimentală

### *Spectrometria de masă*

Spectrometria de masă este cea mai sensibilă metodă de analiză structurală, fiind o tehnică microanalitică, care permite măsurarea maselor moleculare relative a unor compuși unitari, respectiv evidențierea anumitor specii atomice și funcționale existente în compusul analizat.

Spectrometria de masă este o metodă fizică, care permite obținerea ionilor, separarea acestora în funcție de raportul dintre masă și sarcină ( $m/z$ ), și înregistrarea lor, obținându-se spectrele de masă ale unor molecule complexe [4]. Spectrul de masă este reprezentat prin înregistrarea abundenței relative a ionilor în funcție de masa lor.

*Spectrometrul de masă* este un instrument ce produce ioni în fază gazoasă și apoi îi separă după valorile raportului  $m/z$ , dintre masa ionului și numărul de sarcini elementare de pe acel ion. Astfel spectrometria de masă este folosită pentru determinări cantitative și structurale ale atomilor și moleculelor. Identificarea unei molecule dintr-un spectru de masă este mai ușoară decât din alte tipuri de spectre deoarece acesta conține atât masa moleculei cât și masele fragmentelor provenite din disocierea moleculei respective. Pe abscisă este indicat raportul  $m/z$  și pe ordonată abundența relativă. Abundențele relative sunt determinate prin măsurarea ariilor acestora. *Biblioteca de spectre* se utilizează pentru identificarea componentelor prin comparație cu spectre de masă ale unor componente cunoscute. Cea mai importantă sursă de spectre de masă este NIST - National Institute of Standards and Technology.

Elementele unui spectrometru de masă sunt: (1) *sistemul de introducere*, proba de analizat este adusă la presiunea, forma și cantitatea corespunzătoare pentru a fi introdusă în sursa de ioni și ionizată cu eficiență maximă; (2) *sursa de ioni* – atomii sau moleculele neutre sunt ionizate și dirijate ca fascicul practic monoenergetic în instrument; (3) *analizorul*, „inima spectrometrului de masă” – prin deflecții magnetice, electrice sau electromagnetice selectează ionii după valoarea  $m/z$  focalizându-i în același timp pe o fantă de ieșire; (4) *detectorul* – sistemul de transformare a curentului ionic într-o imagine fotografică sau într-un curent electric care poate fi înregistrat.

În cercetările personale privind elaborarea de metode multielement a metalelor toxice și oligoelementelor din probe alimentare și probe de mediu, am utilizat un spectrometru de masă cu plasmă cuplată inductiv ICP-MS Varian 820, din cadrul Institutului National de Cercetare -Dezvoltare pentru Tehnologii Criogenice și Separări Izotopice I.C.S.I Rm Vâlcea, care a demonstrat că este o opțiune viabilă în căutarea unor limite de detecție la nivel de urme din orice matrice (fig. 1.1.).



Figura 1.1. Spectrometrul de masă cu plasmă cuplată inductiv ICP-MS Varian 820 cu autosampler SPS3 Roboprep

### *Cromatografia de gaze*

Metoda cromatografică este cea mai eficace dintre toate metodele de separare a diferitelor substanțe dintr-un amestec, utilizabile până în prezent de tehnologie și de chimia analitică.

*Cromatografia* este o metodă de separare a amestecurilor multicomponente. Ea se bazează pe repartiția diferită a componentelor unui amestec între o fază mobilă și o fază staționară (nemiscibile), având ca urmare deplasarea cu viteze diferite a componentelor purtate de faza mobilă de-a lungul fazei staționare. Această diferență dintre vitezele de migrare ale componentelor este specifică naturii chimice a acestora, depinzând de proprietățile lor fizico-chimice [5]. Eșalonate astfel în timp, componentele sunt purtate de eluent, după ieșirea din coloană, în detector. Aceasta transformă diferența unei proprietăți fizice dintre component și eluent într-un semnal electric proporțional cu concentrația componentului în fază mobilă

gazoasă. Reprezentarea grafică a semnalului detectorului în funcție de timp, obținută cu ajutorul înregistratorului, se numește *cromatogramă*.

Tehnica combinării gaz-cromatografiei cu spectrometria de masă (GC-MS) a devenit extrem de utilă în studiul compoziției unor compuși bioactivi din uleiurile volatile, care se utilizează cu succes atât în tratamente și aromoterapie cât și în alimentație sau parfumerie și produse cosmetice. Determinarea biomoleculilor de interes terapeutic presupune efectuarea unor analize calitative și cantitative pretențioase care urmăresc determinarea până la nivel de nanograme sau picograme a unor compuși de interes prin GC-MS [6].

### *Cromatograf de gaze-spectrometru de masă (GC-MS)*

Tehnica combinării gaz-cromatografiei cu spectrometria de masă (GC-MS) a devenit extrem de utilă în studiul compoziției unor compuși bioactivi din uleiurile volatile, care se utilizează cu succes atât în tratamente și aromoterapie cât și în alimentație sau parfumerie și produse cosmetice. Gaz cromatografia/spectrometria de masă (GC-MS) este o tehnică analitică cuplată folosită în următoarele scopuri: a. confirmarea și identificarea analiților volatili și semivolatili dintr-un amestec complex; b. determinarea masei moleculare și/sau structura elementară a unor volatili/semivolatili necunoscute; c. determinarea structurală a unor volatili/semivolatili necunoscute dintr-un amestec prin intermediul unei potriviri spectrale sau interpretare spectrală. Determinările cantitative [2] prin tehnica cuplajului cromatografie de gaze-spectrometrie de masă pot fi efectuate prin modalități de lucru care cresc sensibilitatea de până la 1000 ori. Pentru metoda de monitorizare pe ion selectat ("selected ion monitoring" SIM) masele individuale ale ionilor sunt selectate continuu sau când se dorește măsurarea mai multor ioni, fiecare este detectat în secvență pentru o perioadă de timp [7]. În modul de lucru SIM sensibilitatea crește de aproximativ  $10^3$  ori față de modul de lucru cu baleaj al spectrului de masă într-un domeniu de masă ales (SCAN). În cuplaj GC-MS, cromatogramele de ioni totali (TIC) reprezintă abundența ionilor în funcție de timpul de retenție. Cromatograma este considerată o "amprentă" a buchetului diferitelor băuturi alcoolice, a esenței de portocale (terpenele) sau a altor fructe, plante medicinale, ceaiuri sau a diferitelor compoziții de parfumuri [4].

În cercetările personale am utilizat un spectrometru de masă Thermo Finnigan GC-MS (DSQ) cuplat cu un cromatograf de gaze Trace GC (fig. 1.2.). Coloana capilară RTx-5MS a avut lungimea de 30m, diametru de 0,25mm și 0,25  $\mu$ m grosimea filmului de metil fenil polisiloxan.

Cu ajutorul sistemului Thermo Finnigan Trace GC-Trace DSQ s-au elaborat metode calitative și cantitative, în cadrul Laboratorului de Gaz Cromatografie și Spectrometrie de Masă, din cadrul departamentului de Fizică Biomedicală, Cluj-Napoca care urmăresc determinarea până la nivel de nanograme sau picograme a unor compuși de interes terapeutic. Componentele bioactive ale plantelor sunt de o mare varietate și deosebit de utile pentru sănătatea umană. Principiile bioactive din plante sunt tot mai mult studiate pentru efectul lor terapeutic (antiparazitar, antifungic, citostatic, etc.).



*Figura 1.2. Sistemul Thermo Finnigan Trace GC-Trace DSQ echipat cu autosampler*

De asemenea, metoda cuplajului cromatografie de gaze-spectrometrie de masă (GC-MS) este metoda adecvată utilizată în separarea și identificarea componentilor cu potențial cancerigen (trihalometanii din apele potabile) sau alergenice din plantele utilizate în alimentație și parfumerie. Prin cromatografia de gaze cuplată cu spectrometrie de masă s-au obținut performanțe spectaculoase, în special în analiza poluanților organici din atmosfera urbană, realizându-se separarea și identificarea a peste 100 de componente prezente în aer. Cromatografia de gaze a rezolvat până în prezent un număr considerabil de cazuri de separare (peste 20.000). Cromatografia în fază gazoasă cuplată cu spectrometria de masă a avut ca obiective obținerea de noi proceduri, rapide și precise, neinvazive sau minim invazive de diagnosticare a unor boli grave, prin utilizarea unor metodologii și tehnici avansate analizând biomarkeri sau amprenta

metabolomică. Cuplajul GC-MS întrunește calitățile deosebite ale celor două aparate, separare ideală prin gaz-cromatografie și identificare ideală prin spectrometrie de masă. Tehnicile ID-MS și ID-GC/MS, utilizând compuși marcați cu izotopi stabili care permit evitarea contaminanților prezenți în probe, sunt tehnici fizice performante de analiză cantitativă la nivel de urme de mare precizie, cu numeroase posibilități aplicative interdisciplinare.

## 2. Validarea metodelor de analiză cantitativă

### *Proceduri de preparare a probelor (sampling)*

#### *Parametrii de validare ai metodei*

Determinarea biomoleculilor de interes terapeutic presupune efectuarea unor analize calitative și cantitative pretențioase care urmăresc determinarea până la nivel de nanograme sau picograme a unor compuși de interes. Pentru efectuarea analizei calitative și cantitative trebuie parcurse două etape importante [8]:

- scoaterea compusului de interes din matrice cu un randament ridicat
- aducerea compusului de interes la nivelul de sensibilitate al metodei de analiză abordate (îmbogățirea compusului de interes) printr-o procedură de extracție adecvată și determinarea sa cantitativă printr-o metodă de analiză de încredere. În funcție de natura probelor se vor utiliza diferite metode de extracție. Metodele de preparare a probelor utilizate în cercetările noastre au fost următoarele: extracția lichid-lichid a compușilor organici (LLE), extracția pe fază solidă (SPE, SPME, HS), extracția cu solvent asistată de ultrasunete (USE) și extracția cu solvent asistată de microunde (MWE). Metodele de analiză trebuie să fie validate (demonstrarea corectitudinii lor) prin testarea unor parametrii de validare utilizând probe etalon cu concentrații cunoscute a compușilor de interes.

Indiferent de metoda de analiză cantitativă adoptată, ea trebuie validată privind următorii *parametrii de validare*:

*Liniaritatea* – capacitatea unei metode analitice de a permite, într-un domeniu prestabilit obținerea de rezultate de testare variabile, direct proporționale cu concentrația analitului în probă. Liniaritatea este demonstrată prin ridicarea curbelor de calibrare pentru analiții considerați și calculul coeficientului de corelație aferent. Se recomandă ca valoarea de referință 0,997 pentru coeficientul de corelație, dar se admit și valori mai mici, în situația în care abaterea valorii calculate față de valoarea de referință pentru toate punctele de calibrare, nu depășește 5% din valoarea efectivă a analitului. Ecuația dreptei de regresie,  $y=ax + b$ , aplicată rezultatelor, trebuie să aibă ordonata la origine,  $b$ , apropiată de zero. Se calculează *panta dreptei de regresie*,  $a$ , și *coeficientul de regresie*  $r$ , care pentru o bună liniaritate trebuie să tindă către 1 [4].

*Limita de detecție (LD), limita de determinare cantitativă (LQ).* Limita de detecție este reprezentată de cantitatea cea mai mică de analit care se poate detecta prin metoda considerată. Cantitatea de analit la limita de detecție trebuie să fie mai mare decât eroarea asociată măsurătorii (raportul semnal/zgomot=2 sau 3). Limita de determinare cantitativă este reprezentată de cantitatea cea mai mică de analit care dă măsurători precise, cu un raportul semnal/zgomot =10 [4].

*Acuratețea (exactitatea)* reprezintă gradul de apropiere între rezultatele obținute prin metoda analitică și valori acceptate ca valori de referință sau convențional adevărate. Se determină prin analiza unui material de referință certificat sau prin analiza unei probe generată ca material de referință. Exactitatea estimează *erorile sistematice*. Ghidul Eurachem/CITAC [9-11] definește eroarea sistematică ca fiind "diferența între media aritmetică a rezultatelor unui număr mare de măsurări ale aceluiași masurand în condiții de repetabilitate și o valoare adevărată a măsurandului". Cu erorile sistematice, rezultatele sunt deplasate într-o direcție sau alta, adică sunt fie mai mici, fie mai mari decât ar trebui să fie. De asemenea, se utilizează matrici cu cantitate cunoscută de analit, etaloane sau standarde, în care încrederea este deplină. Eroarea este diferența dintre valoarea adevărată și cea măsurată.

Pentru a exprima eroarea se calculează deviația standard relativă, RSD(%), cu relația:

$$R.S.D(\%) = \frac{|val.masurata - val.adev.}|}{val.adev.} \cdot 100 \quad (2.1)$$

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \text{ iar } x_i = \frac{y_i - b}{a} \quad [4] \quad (2.2)$$

unde valoarea măsurată în cazul a  $n$  măsurători reprezintă  $\bar{x}$ :

*Precizia* reprezintă gradul de apropiere între rezultatele obținute prin măsurarea unei serii de probe realizate din aceeași probă omogenă, în condițiile impuse de metodă.



Precizia și reproductibilitatea caracterizează concordanța dintre rezultatele măsurătorilor individuale sau a seriilor multiple de măsurători. Cu alte cuvinte, precizia este *eroarea statistică*. Precizia se exprimă cu ajutorul deviației standard relative sau a coeficientului de variație (C.V.) exprimat în procente:

$$C.V.\% = R.S.D.(\%) = S.D. \cdot 100 / M \quad (2.3)$$

unde *S.D.* este deviația standard pentru *n* măsurători și este dată de relația:

$$S.D. = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n(n-1)}}, \quad (2.4)$$

unde  $\bar{x}$  este media măsurătorilor individuale *i* și este dată de relația (2.2) [4]. *M* este valoarea medie calculată (2.2).

*Specificitate* - caracteristica unei metode de analiză care dă un singur răspuns pentru un singur analit.

*Selectivitatea* - capacitatea unei metode analitice de a măsura cu acuratețe un analit în prezența altor analiți și a unor posibili interferenți. Pentru procesele cromatografice este asigurată prin stabilirea corectă a parametrilor separării cromatografice, iar pentru MS prin alegerea corectă a ionilor, fără interferențe în domeniul de concentrații ales, comparativ cu alți ioni.

*Robustețea* - stabilitatea metodei, ca rezultate analitice, la variații ale parametrilor operaționali. Se verifică prin inducerea controlată a unor abateri de la parametrii operaționali (într-un domeniu realist ales) și verificarea efectului asupra rezultatelor.

Cele mai utilizate metode de calibrare și de determinare a concentrației compușilor sunt:

- metoda curbei de etalonare (normarea de arie)

Concentrația componentului necunoscut (*X*) se calculează folosind aria picurilor, după formula:

$$X(\%) = \left( \frac{A_x}{\sum_i A_i} \right) \cdot 100 \quad (2.5)$$

- metoda standardului intern. Prin adăugarea *standardului intern* înainte și după extracție se poate testa *randamentul de extracție*. Standardul intern trebuie să fie ales astfel încât el să se separe foarte bine de ceilalți componenți ai probei [4]. Această metodă constă în adăugarea la amestecul de analizat a unei substanțe de referință (denumită standard) de concentrație cunoscută *C<sub>S</sub>* (% greutate). În acest caz concentrația componentului *l* se calculează cu relația:

$$C_i = \left( \frac{A_i / f_i}{A_s / f_s} \right) C_s \cdot 100\% \quad (2.6)$$

- metoda adițiilor standard. În această metodă, pentru determinarea concentrației *C<sub>i</sub>* a componentului *l*, se va determina aria acestuia, *A<sub>i</sub>*. Se adaugă apoi o cantitate cunoscută din acest component, de concentrație standard *C<sub>S</sub>* la probă și se determină aria *A'<sub>i</sub>* (compusă din *A<sub>i</sub>*+*A<sub>S</sub>*) de pe noua cromatogramă. Concentrația *C<sub>i</sub>* se determină din relația:

$$C_i / (C_i + C_s) = A_i / A'_i \text{ de unde rezultă } C_i = C_s \cdot A_i / (A'_i - A_i) \quad (2.7)$$

- metoda standardului extern. La concentrația *C<sub>i</sub>* necunoscută a unui component *i*, din amestecul analizat îi corespunde aria picului *A<sub>i</sub>*. Apoi se introduce în cromatograf o probă din același component dar de concentrație cunoscută *C<sub>S</sub>*. Se impune următoarea observație: concentrația standardului extern nu trebuie să fie prea mult diferită de concentrația componentului de determinat.

Concentrația componentului necunoscut se calculează cu relația:

$$C_i = A_i C_s / A_s \quad (2.8)$$

Utilizarea izotopilor multilplu marcați din analit ca standarde interne cât și prezența abundențelor izotopice naturale în plasmă, necesită corecția spectrului de masă și extragerea informației de interes prin deconvoluția spectrului de masă (separarea informațiilor suprapuse și corecția adecvată).

Matricea design a fost construită în primul rând din fracțiile molare ale spectrului de masă al teofilinei naturale, al traserului și al standardului intern iar când a fost nevoie, prin construirea sintetică a spectrului de masă. A fost necesară rezolvarea unui set de ecuații liniare simultane fiecare descriind contribuțiile izotopice de forma:

$$I_x = \sum_{x=i,j} A_i \cdot X_j, \quad (2.9)$$

unde  $I_x$  reprezintă abundența relativă a ionului  $x$  iar  $X_j$  este abundența fracțională necunoscută

Abundența relativă a ionilor contributori ( $A_i$ ) s-a calculat pentru doi din cei mai intensi ioni, formând ecuațiile simultane în notație matricială:

$$I = A \cdot X \quad (2.10)$$

Soluția celor mai mici pătrate a lui  $X$  poate fi obținută utilizând matricea pseudoinversată:

$$X = (A^T \cdot A)^{-1} \cdot A^T \cdot I \quad (2.11)$$

Metoda diluției izotopice prin spectrometrie de masă (ID-MS) este simplă, precisă și rapidă.

### 3. Determinarea unor principii active din plante

Determinarea calitativă și cantitativă a unor compuși prezenți în uleiurile volatile este un subiect de cercetare modern [12-22]. Uleiurile volatile se utilizează cu succes atât în tratamente și aromoterapie cât și în alimentație sau parfumerie și produse cosmetice. Uleiurile esențiale sunt substanțe volatile aromatice produse de plante și pot fi extrase prin diferite metode. Sub aspect chimic, uleiurile volatile nu sunt compuși unitari, ci reprezintă amestecuri de zeci sau chiar sute de substanțe organice (aldehide, cetone, alcooli, esteri, etc.) cunoscute sub denumirea de terpeni și terpenoide. S-a observat că un ulei volatil are mai mulți compuși principali dintre care unul este caracteristic, compus de bază, care dă aroma uleiului. Identificarea compușilor organici din plante este importantă deoarece separarea și cunoașterea structurii lor chimice constituie pasul esențial în explicarea acțiunii lor terapeutice caracteristice. În prezent plantele sunt tot mai mult studiate pentru acțiunile lor terapeutice.

Prezența unor falsuri conduce adesea la modificarea proprietăților uleiurilor volatile, în special ale celor terapeutice, care rezultă prin acțiunea sinergică a tuturor componentelor. Mai mult, uleiurile volatile, diferitele extracte de plante sunt utilizate în suplimentele alimentare sau în scopuri medicinale, și prin urmare este crucial să se asigure autenticitatea și calitatea produsului respectiv, existând riscul ca falsificarea lor să inducă efecte negative severe asupra sănătății consumatorului.

Proprietățile uleiurilor volatile sunt direct corelate cu compoziția lor, atât din punct de vedere calitativ cât și cantitativ. Determinarea amprentei cromatografice a uleiurilor volatile și caracterizarea compușilor extractelor din plante s-a efectuat prin tehnica GC-MS. Determinarea biomoleculilor de interes terapeutic a presupus efectuarea unor analize calitative și cantitative pretențioase care urmăresc determinarea până la nivel de nanograme sau picograme a unor compuși de interes. Pentru caracterizarea unor principii active din plante în cantități de ordinul microgramelor, s-au utilizat proceduri eficiente atât ca timp, materiale și precizie.

Fiecare plantă este caracterizată de o aromă proprie, de un miros sau gust specific doar speciei din care face parte. Acest lucru se datorează existenței unui compus sau unui grup de principii active care se găsesc în cantitate și concentrație mai mare decât celelalte substanțe componente. Separarea și cunoașterea structurii chimice constituie pasul esențial în explicarea acțiunii lor terapeutice care le caracterizează. Din acest considerent, metodele de extracție, de separare și apoi identificarea compușilor cu ajutorul cuplajului GC-MS, constituie cei mai importanți pași în analiza compoziției chimice a plantelor studiate. Metodele de analiză cantitativă au fost validate studiind parametrii de validare ca: precizia, acuratețea, limita de detecție și de cantitate, randamentul de extracție [23-25].

#### *Elaborarea și testarea comparativă a principalelor metode de extracție utilizate în analiza principiilor active din plante*

Studiile pentru obținerea unor metode de extracție cât mai eficiente a compușilor organici dintr-o matrice biologică sunt de mare importanță. Scopul studiului nostru a fost comparația dintre 4 metode de extracție [26], pentru caracterizarea unor arome extrase din vermur și biter, tincturi obținute din extracte de plante aromatice:

##### *Procedura de extracție lichid-lichid (LLE)*

S-a amestecat în raportul 3:3:1 (v/v/v) 30  $\mu$ l *amestec standard M* cu 0.9 ml soluție apă distilată: etanol (1:1, v/v) (sau 0.9 ml extract hidroalcoolic) cu 0.9 ml apă distilată și 0.3 ml *solvent A*. Amestecul s-a agitat timp de 1,5 minute iar apoi s-a centrifugat 2 minute. S-a utilizat ca *standard intern* o cantitate de 1  $\mu$ l de 3-hepten-2-one,

##### *Procedura de extracție pe fază solidă (SPE)*

Faza solidă s-a condiționat cu 3 ml metanol și 3 ml apă distilată. După ce se aplică proba, faza solidă se spală și se usucă la vid timp de 10 minute iar apoi urmează eluția probei cu 3 x 0.3 ml *solvent A*. Solventul utilizat în cazul cartușului RP-18 cu sicagel legat cu C-18 este *solventul A*, iar în cazul cartușului TSC (amestec de faze) solventul este cloroform:acetona (1:1, v/v). Eluentului obținut i s-a adăugat 1μl *standard intern*, iar apoi s-a injectat în cromatograf o cantitate de 1μl din soluția finală.

#### *Procedura de extracție cu microunde (MWE)*

Metoda de extracție cu microunde se realizează la o frecvență de 2.45 GHz timp de 4 secunde, la o temperatură de 60°C, într-o fiolă cu capac rezistentă la temperatură și presiune (de 3 ori câte 4 sec, cu răcire cu apă rece a fiolei). Cantitatea de 30 μl din *amestecul standard* este adăugată la 0.9 ml soluție hidroalcoolică (apa: etanol, v/v), 0.9 apă distilată și 0.3 ml *solvent A* sunt mixate și supuse extracției la microunde. Apoi 1μl de 3-hepten-2-one, *standard intern*, este adăugat supernatantului și injectat de două ori (n'=2) în cromatograf, pentru determinarea randamentului de extracție aferent metodei.

#### *Procedura de extracție cu ultrasunete (USE)*

Metoda de extracție se realizează cu ultrasunete iradiate printr-o tijă introdusă în proba de extracție, într-un timp de 1 minut, astfel ca temperatura să nu depășească 60°C. Proba de analizat se așează într-un vas care conține 30μl *amestec standard M*, 0.9ml soluție hidroalcoolică, 0.9ml apă distilată și 0.3ml *solvent A*. După extracție, 1μl 3-hepten-2-one s-a adăugat la supernatant și s-a injectat de două ori.

Pentru cercetările noastre s-a utilizat un cromatograf de gaze cuplat cu un spectrometru de masă (GC/MS), Thermo-Quest, Finnigan, Trace GC-Trace DSQ. Compușii amestecului au fost separați pe o coloană capilară Rtx-5MS, 30m x 0.25 mm, 0,25 μm. Programul de temperatură: 50°C (timp de 2 min), apoi creștere cu viteza de 8°C/min la 310°C (timp de 10 min). Temperatura interfeței GC/MS și a sursei de ioni: 250°C. Energia electronilor: 70 eV, curentul de emisie al electronilor: 100μA. După stabilirea parametrilor de lucru a urmat scanarea în modul EI în domeniul de masă 30-500 Da. Identificarea componentelor separați cromatografic s-a făcut prin comparare cu spectrele de masă din biblioteca de spectre *NIST* și *Wiley*.

#### *Rezultate și discuții*

Tabelul 3.1 prezintă valorile medii ale randamentului fiecărei metode de extracție a principiilor active. Cele mai bune rezultate ale randamentului s-au obținut în cazul MWE (103%) și USE (101%), urmate de SPE (85.5%) pe cartuș RP-18 și LLE (97.3%). Valorile randamentelor de extracție pentru cele două metode de extracție MWE (103.3%) și USE (101.19%), se datorează erorilor de extracție și probabil faptului că în timpul extracției, condițiile de lucru au determinat o creștere mai accentuată a temperaturii, ceea ce a condus în final la o concentrare a eșantionului supus analizei.

**Tabel 3.1 Randamentul de extracție [%] pentru componentii studiați prin diferite metode de extracție**

<b>Component</b>	<b>t<sub>R</sub></b>	<b>LLE(%)</b>	<b>SPE(%)</b>	<b>TCS(%)</b>	<b>MW(%)</b>	<b>US(%)</b>
Heptenone (SE)	5,4					
cineole(eucalyptol)	7,24	98,97	81,47	68,54	100,84	99,75
linalool	8,58	96,67	86,96	72,07	100,98	100,5
geraniol	11,4	94,31	87,54	77,91	111,48	112,12
alfa-terpenyl-acetate	12,86	97,57	86,13	73,52	102,26	100,37
geranyl acetate	13,3	96,28	83,14	72,75	102,57	99,86
amyl slicitate	15,67	87,23	85,72	73,99	120,91	118,03
myristic acid (C14:0)	18,4	100,82	86,24	75,07	98,02	95,04
palmitic acid (C16:0)	21	97,14	86,73	75,87	96,61	92,95
stearic acid (C18:0)	23,04	96,93	85,54	74,68	95,74	92,07
<i>Valoarea medie</i>		97,3	85,5	73,82	103,3	101,19

**Tabel 3.2 Caracterizarea preciziei LLE pentru extractele de vermur**

<b>Component</b>	<b>Valoare medie</b>	<b>SD</b>	<b>RSD(%)</b>
eucalyptol	8.86	0.14	1.58
fenchone	2.34	0.05	2.35
linalool	30.65	0.31	1.02
terpinen	2.96	0.06	2.16
geraniol	2.12	0.05	2.35
cinnamaldehyde	0.56	0.05	8.89
trans-anethole	4.2	0.09	2.22
thymol	1.55	0.06	4.00
alpha-terpenyl acetate	1.74	0.07	4.06
isobornyl isovalerate	2.07	0.14	6.76
eugenol	2.9	0.11	3.73
miristicin	1.14	0.05	4.8
elemicin	1.08	0.03	3.16

herniarine	0.93	0.05	5.24
bisabolol oxid A	1.04	0.03	3.17
myristic acid	1.24	0.07	5.7
ethyl miristate	1.39	0.14	9.78
lactone	0.78	0.05	6.37

Eucaliptolul este principiul activ prezent în salvie, menta 5%, dafin 50%, levănțică și isop. Linalolul este un component important în coriandru 70%, magheran 30%, dafin 20%, salvie, oregan, melisa. Geraniolul se întâlnește în uleiul de trandafir, coriandru 3%, cinamaldehida se găsește în scorțișoară, eugenolul în cuișoară, iar bisabololul în mușețel. Cei mai numeroși și importanți compuși ai uleiurilor esențiale sunt terpenele și derivații lor, cum ar fi: geraniolul în flori de trandafir și eucalipt, linalolul în lăcrămioară, flori de portocal, coriandru, citralul în coaja de portocale, borneol și camfor.

Vermutul și biterul suedez au o acțiune decongestivă, antivirală, cicatrizantă, antiinflamatoare și stimulative asupra circulației și a respirației.

Comparația între cele 4 metode de extracție s-a dovedit utilă pentru caracterizarea compușilor bioactivi din plante.

Valorile obținute pentru randamentul de extracție prin MWE (103%), USE (101%), LLE (97%) și SPE (86%) au fost comparabile.

Caracterizarea aromei de biter și vermut prin metoda *microextracției* LLE a dat o precizie (R.S.D.) mai mică de 11%. Metoda de extracție LLE este o metodă complementară analizelor calitative și cantitative a principiilor active din extracte. Comparația diferitelor arome din plante provenite din diferite surse au arătat diferențe calitative și cantitative.

### *Caracterizarea unor extracte pentru uz terapeutic prin GC-MS*

Metodele de extracție prezentate [27] au fost aplicate pentru a caracteriza principiile active din "Floratic", un biter utilizat pentru uz intern sau extern, în medicina tradițională din țara noastră. Este preparat din unele plante din România, zona Clujului, ca extract hidroalcoolic, care conține 12 de specii de plante: Aloe (frunze), Angelica archangelica (radacină), Juniperus communis (ienupăr), Fraxinus excelsior (fruct de frasin), Gentiana lutea (radăcină de ghintură), Iris palida (rădăcină de iris), Robinia pseudacacia (flori de salcâm), Polygonum aviculare (troscot), Arctium lappa (rădăcină de brusture), Laurus nobilis (frunze de dafin dafin) și Abies alba (frunze de brad). "Floratic" prezintă principii active, oferind un mod simplu și eficient de vindecare pentru un număr mare de afecțiuni. În scopul analizei cantitative pentru compușii de aromă și biologic activi, extractele de Floratic și extractul din radacină de Angelica archangelica au fost supuse la cele două proceduri de extracție (LLE și SPE) prezentate mai sus.

#### *Rezultate și discuții*

Pentru validarea metodei, 20ng/ml sau 2μg /g de miristat de metil, ca standard intern (SI), a fost adăugat înainte de extracție. Liniaritatea a fost studiată în intervalul 0-24ng. Dreptele de regresie obținute pentru standarde au dat coeficienți de corelație buni, mai mari decât 0.99 pentru fiecare standard. Precizia pentru metoda de extracție LLE a dat o deviație standard relativă (RSD) mai mică decât 6% (n=4) și pentru metoda de extracție SPE, (RSD) a fost mai mică de 3% (n=5) pentru amestecul etalon. Randamentul de extracție pentru LLE a fost 81% (n=3) și pentru SPE 92% (n=4). LD a fost 10pg, S/N=10 pentru fiecare standard. Randamentul de extracție prin LLE (81%), utilizând un amestec corespunzător de solvenți a fost comparabil cu cel pe fază solidă SPE (92%).

În extractul biterului suedez Floratic s-a determinat un component important (25%) cu activitate antiinflamatoare: *matairesinol* *M=358*, iar în extractul de echinaceea s-au identificat antioxidanți: acid cinaric, acid caftaric și acidul cicoric. Biterul conferă efecte sedative, antiseptice, antiinflamatoare, carminative, antireumatice, antidepressiv și regeneratoare de țesuturi. Un nivel ridicat de lignanți, lariciresinol și matairesinol din biterul "Floratic" pot contribui la efectul antiinflamator și la protecția în cazul bolilor coronariene și aterosclerozelor. Lignanții sunt una dintre principalele clase de fitoestrogeni, care acționează ca antioxidanți. Lignanții pot fi metabolizați la mamifere formând pinoresinol, lariciresinol, secoisolariciresinol, matairesinol, hidroximatairesinol, siringaresinol și sesaminul. Secoisolariciresinolul și matairesinolul au fost primii lignanți identificați în produsele alimentare. Pinoresinolul și lariciresinolul sunt cei mai recentți lignanți identificați în plante, care au o contribuție substanțială la alimentația dietetică. Lignanții plantelor, precum și metabolizii lor prezintă proprietăți antiinflamatoare.

Metodele prezentate sunt potrivite pentru determinarea la nivel de urme a compușilor organici în extractele hidroalcoolice din plante.

### *Analiza flavonoizilor din Orthosiphon stamineus Benth prin GC-MS*

Flavonoizii sunt substanțe chimice, cu rol antioxidant; unele stimulează circulația sângelui, altele au efect antiiritant, antiinflamator sau diuretic. Antioxidanții sunt molecule stabile cu electroni în plus sau cu

capacitatea de a primi electroni suplimentari. Ei constituie sistemul natural de apărare al organismului împotriva efectelor dăunătoare ale radicalilor liberi, apărând structurile celulare și ADN-ul de efectele dăunătoare ale radicalilor liberi ce caută să capteze electroni. Antioxidanții donează sau primesc un electron suplimentar pentru a neutraliza radicalii liberi și a pune capăt efectului de cascadă al oxidării. Deoarece radicalii liberi nu sunt creați numai în mediul înconjurător ci și în organismul nostru, pentru sănătate și longevitate este esențial să avem un flux continuu de antioxidanți, asigurat de un stil de viață sănătos și echilibrat.

Scopul acestui studiu [28] a constat în studiul comparativ al extracției cu diferiți solvenți a compușilor organici din *Orthosiphon stamineus* Benth. Probele extrase au fost studiate prin GC-MS fără derivatizare, deoarece flavonoizii sunt metoxilați și se separă bine cromatografic.

### Rezultate și discuții

Frunzele uscate de *Orthosiphon stamineus* Benth au fost obținute de la Caesar & Loretz, Germania. Probele vegetale au fost folosite pentru a obține 15 extracte diferite prin folosirea a 15 solvenți diferiți. Probele extrase au fost preparate cu: 1.hexan, 2.eter etilic, 3.cloroform, 4.diclorometan, 5.benzen, 6.toluen, 7.acetonă, 8.cetonă metil-etil, 9.dioxan, 10.metil-acetat, 11.etil-acetate, 12.metanol, 13.etanol, 14.iso-propanol și 15.n-butanol.

Cromatogramele diferiților componenți extrași cu ajutorul solvenților au arătat flavonoizi și steroli foarte asemănători (fig. 3.1.)

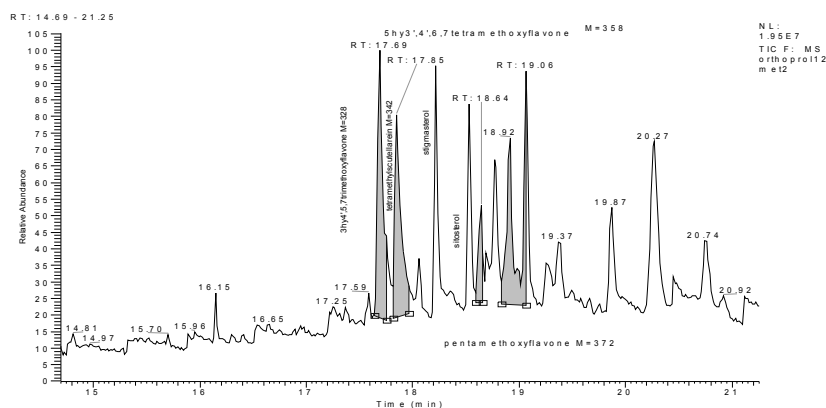


Figura 3.1. Cromatograma de separare pentru extractul *Orthosiphon*  
Principali flavonoizi identificați din spectrul de masă au masele moleculare  
 $M=328$ ,  $M=342$ ,  $M=358$  și  $M=372$

În fig. 3.1. este prezentată separarea cromatografică pentru cei mai importanți flavonoizi determinați în *Orthosiphon stamineus* Benth: (a) 3-hidroxi 4',5,7-trimetoxiflavonă  $M=328$  (17.7 min); (b) 4',5,6,7-tetrametoxiflavonă  $M=342$  (17.86 min); (c) 5-hidroxi, tetrametoxi-flavonă  $M=358$  (18.52 min, 18,65 min); (d) pentametoxiflavonă  $M=372$  (18.65 min and 18.94 min).

GC-MS se dovedește a fi o tehnică utilă pentru caracterizarea extractelor de flavonoizi obținuți din plantele studiate ca și compuși nederivați.

Compararea diferiților solvenți din punct de vedere al flavonoizilor a arătat faptul că hexanul și butanolul sunt cei mai nepotriviți solvenți pentru acești compuși. S-a dovedit că acetona, sau solvenții aromatici, metil etil cetona și acetatul de etil au capacitate redusă de extracție. Cei mai buni solvenți au fost alcoolii, în special metanolul și izopropanolul.

### Studiul unor principii active din plante medicinale prin GC-MS

Scopul acestui studiu [29,30] a fost dezvoltarea unei metode rapide pentru determinarea cantitativă a compușilor organici din plante ca materii prime în industria cosmetică, farmaceutică și alimentară.

Metoda a fost folosită pentru o comparație între principiile active determinate în plantele medicinale cunoscute și des utilizate încă din vechime: *Matricaria chamomilla* (mușetel), *Melissa officinalis* (melisa), *Urtica dioica* (urzică), *Lamium album* (urzică albă) au fost recoltate din patru zone geografice diferite (Petroșani, Cătălina (Cluj), Baia Mare și Vatra Dornei din România, achiziționate de la unități comerciale. Lotul martor pentru probele de control a fost procurat de la Institutul Agronomic din Cluj-Napoca.

### Rezultate și discuții

Liniaritatea semnalului cuplajului GC-MS a fost studiată în intervalul de 0-100 micrograme ( $\mu\text{g}$ ). Dreptele de regresie obținute pentru cele două standarde (3-Hepten-2-onă și metil miristatul) au dat coeficienții de corelație mai mari decât 0.995. Precizia metodei este caracterizată prin valori ale deviației standard relative (RSD) mai mici de 3%. Valorile medii au fost calculate în urma a patru proceduri de

extracție (n=4) și două injecții (n=2) ale fiecărui extras. Procedura de extracție pentru LLE fost de 97% (n=4) pentru amestecul etalon. Metoda a fost utilizată la determinarea de până la 10μg cantitate de substanță cu o limită de detecție (LOD) de 10ng pentru un raport semnal/zgomot S/N=10 pentru fiecare standard utilizat.

Validarea metodei a fost testată pe un extract hidroalcoolic din plante, păstrat șapte zile la temperatura camerei.

Principiile active din extractele de mușetel sunt prezentate în tabelul 3.3.

*Matricaria chamomilla* (mușetel) este caracterizată de cantități mari de compuși bioactivi,  $\alpha$ -bisabololul, cel mai important component activ responsabil pentru efectele antiinflamatoare, este diminuat sau transformat (oxidat) în alți compuși.

**Tabelul 3.3 Identificarea prin GC-MS a compușilor organici în extractele LLE de *Matricaria chamomilla* (mușetel)**

Component	t <sub>R</sub> (min)	1. μg/g	2. μg/g	3. μg/g	4. μg/g
1. 1,3 butandiol	4.2	85.6	61.9	-	40.9
2. 4-vinyl phenol	11.8	9.2	6.9	-	-
3. 2-methoxy-6-vinyl phenol	14.8	178.6	103.1	-	-
4. trans-beta-farnesene	15.6	-	68.7	61	-
5. spathulenol M=220	17.6	70.9	74.2	-	-
6. alpha-bisabolol oxide B M=238	18.6	160.2	230.9	216.8	55.1
7. alpha-bisabolol M=222	18.9	485.3	-	72.1	312.3
8. bisabolone oxide M=236	19.1	-	233.7	100	-
9. methyl myristate (SI=2mg/g)	19.5	2000	2000	2000	2000
10. herniarin M=178	19.7	893.2	378	48.5	50.5
11. chamazulene M=184	19.7	46	82.5	97.1	49.0
12. bisabolol oxide A M=238	20.00	1798	1093	1050	682.2
13. en-in-dicycloether M=200	21.7	1647	941.6	563.7	1292.1
14. en-in-dicycloether M=200	21.8	582	277.7	132	215.2
15. methyl palmitate M=270	22	181.4	68	-	-
16. palmitic acid M=256	22.6	179.6	433	-	-
17. ethyl palmitate M=284	22.8	-	0	46.9	29.3
18. 9-octadecenoic acid	23	-	34.4	-	-
19. 9,12-octadienoic acid	24.8	-	41.2	-	-
20. methyl linoleate M=294	24.8	-	0	54	-
21. ethyl oleate M=310	24.8	-	0	53.4	-
22. achilin M=246	25.1	18.4	20.6	27	-
23. methyl heritol M=258	25.2	-	-	27	35.9
24. M=288	25.9	-	-	101.9	27.8
25. M=288	26.4	-	68	148.3	20.2
26. glyceryl oleate diacetate M=440	27.6	240	96	129	27.8
27. stearic acid M=270	28	-	24.7	-	-
Total value		8575.2	4381	2928.7	2838.3

t<sub>R</sub>= timp de retenere; 1. *Matricaria Chamomilla* cultivate in zona Baia Mare; 2. *Matricaria Chamomilla* cultivate in zona Petroșani; 3. *Matricaria Chamomilla* cultivate in zona Catalina (Cluj-Napoca); 4. *Matricaria Chamomilla* cultivate in zona Vatra Dornei

Studiul are ca rezultate variațiile cantitative de principii active, care pot fi întâlnite în plantele medicinale de diferite sorturi din aceeași specie, recoltate din zone geografice diferite ale României: *Matricaria chamomilla* este caracterizată de cea mai mare cantitate de principii active în zona Baia Mare, urmată din punct de vedere calitativ de sortul recoltat din zona Petroșani, Cluj-Napoca și Vatra Dornei. Analiza plantelor de *Melissa officinalis* (melisa) prin GC/MS arată un conținut scăzut de principii active. Cele mai importante principii active identificate, responsabile pentru aromă și efectele terapeutice au fost: citronelal, metil citronelal, Z-citral și E-citral. Zonele în care sorturile analizate au fost foarte sărace în principii active sau lipsite total de acestea au fost cauzate probabil de condițiile geografice, calitatea solului, climă sau procesele de recoltare și uscare. Cea mai mare cantitate de principii active a fost determinată în sortul recoltat din zona Cluj-Napoca, urmat de cel din Baia Mare și Cătălina. Analiza sorturilor de *Urtica dioica* (urzică) și *Lamium album* (urzică albă) indică o cantitate foarte redusă de principii active. O posibilă explicație a absenței lor ar fi condițiile improprie de creștere, recoltare și uscare sau condițiile climatice.

### Caracterizarea compușilor de aromă a unor uleiuri volatile prin GC-MS

Uleiurile esențiale au o mare importanță în aplicațiile din parfumerie și preparatele cosmetice de calitate, atât datorită mirosului lor intens, plăcut, dulce și floral cât și prin proprietățile lor de fixare. Scopul acestui studiu a constat în identificarea compușilor aromați și parfumați al unor uleiuri esențiale (mentă, busuioc, lavandă, trandafir) sau extracte de plante responsabile de parfumul plăcut floral sau gustul specific [31].

Cei mai importanți compuși odoranți au fost: fenetol, nerol, geraniol, linalool, geranial, nonadecan, heneicosan, tricosan, 9-eicosan. Unii dintre compușii identificați cum sunt oxidul de trandafir și trans-beta-damascenona, deși în cantități foarte mici, sunt responsabili pentru mirosul frumos al florilor studiate. Se observă că estragolul (84.5%) este caracteristic uleiului de busuioc, iar eucaliptolul (10.5%), linaloolul (30.2%), camforul (5.9%) și acetatul de linalil (29.9%) sunt compușii aromați cei mai importanți identificați în uleiul de lavandă.

Cei mai importanți compuși identificați în planta *Mentha piperita* au fost: mentol (35%), mentonă (28%), isomentonă (8%), 1,8 cineole (7.5%), trans-sabinen hidrat (5%), limonen (3%), mentil acetat (3%), β-cariofilen (3.6%), germacren (2.6%), și de asemenea în cantități mici: α-pinen (0.2%), sabinen (0.1%), β-pinen (0.6%), β-mircen (1.74%), 3-octanol (0.5%), pulegona (0.5%), piperitona (1%), aromadendren (0.1%), cis-p-menten-1-ol (0.01%). Compușii identificați în *Mentha crispa Labiatae* sunt: carvone (74%), trans-sabine hydrate (6%), limonen (3.5%), eucaliptol (1,8 cineol) (3%), pinocarveol (1%), fitol (1%), carvon oxid (0.5%), beta-citronelol (0.5%), loliolida (0.2%), etil palmitat (0.1%).

În urma studiului s-a constatat că fenetolul se găsește în concentrația cea mai ridicată (69,18%) în uleiul de trandafir provenit din Ucraina și în concentrația cea mai scăzută (52,57%) în cel din Moldova. Geraniolul are cea mai ridicată concentrație în uleiul de trandafir provenit din Moldova (8,45%) și cea mai scăzută în cel din Ucraina (5,84%). Rose oxide se găsește în cea mai mare cantitate în uleiul de trandafir din Bulgaria (0,1%), valoare urmată de 0,07% măsurată pentru uleiul de trandafir din Moldova. Trans-beta-damascenona a fost pusă în evidență (0,06%) în uleiul de trandafir din Moldova. Cele mai mari concentrații obținute pentru linalool au fost evidențiate în uleiurile din Moldova și Bulgaria (0,4%). Nerolul are valoarea cea mai mare obținută pentru uleiul de trandafir din Moldova (14,5%). Geraniolul, deși în cantități mici, a fost evidențiat în toate cele trei cazuri având valori foarte apropiate între ele, 2,09% în uleiul din Moldova, 1,61% pentru Bulgaria și 1,78% în Ucraina. Nonadecanul se găsește în toate cele trei zone în concentrația medie 3,8% ca și heneicosanul de aproximativ 2%. Valoarea evidențiată pentru tricosan din uleiul de trandafir din Moldova (1,71%) este mai mare decât cele măsurate în celelalte două zone de interes, 0,91% (Bulgaria) și 0,74% (Ucraina). Cea mai mare valoare a eicosanului a fost înregistrată în uleiul de trandafir din Bulgaria, 0,5%. Ca medie, cea mai mare frecvență a concentrațiilor mari în care se găsesc compușii aromatici din uleiurile de trandafir investigați pentru cele trei zone o găsim în Moldova. Acest lucru se reflectă probabil și în parfumul florilor.

Identificarea compușilor organici din plante este importantă deoarece separarea și cunoașterea structurii lor chimice constituie pasul esențial în explicarea acțiunii lor terapeutice caracteristice. După cum am văzut fiecare ulei volatil are mai mulți compuși principali dintre care unul este caracteristic, compus de bază, care dă savoarea și aroma uleiului.

### **Caracterizarea unor nutrienți biologic activi (compuși volatili, acizi grași, aminoacizi, compuși cu acțiune terapeutică) prin GC-MS**

Au fost elaborate și metode de extracție, separare cromatografică și identificare de spectre a unor uleiuri vegetale (cătină, uleiuri vegetale, nucă, margarină, ulei de pește) și analiza cantitativă a acizilor grași metilati (FAME) și a altor nutrienți prin GC-MS.

Scopul acestui studiu a constatat în implementarea unei metode analitice sensibile pentru identificarea acizilor grași, vitaminelor F și E și a sterolilor în uleiul de cătină, utilizând spectrometria de masă cuplată cu cromatografie de gaze (GC-MS) [32]. Metoda a fost aplicată pentru testarea compușilor lipofilici după iradierea uleiului de cătină (*Hippophæe rhamnoides* L) la diferite doze (kGy) cu electroni accelerați. Sunt prezentate de asemenea rezultatele obținute prin cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC) [33].

#### **Rezultate și discuții**

În urma analizelor am putut observa cantitatea importantă de acid palmitoleic (C16:1) în pulpă și acid linolenic (C18:3) în semințele de cătină, care se utilizează în industria cosmetică în fabricarea cremelor, și de asemenea cantitatea importantă de acizi grași nesaturați (vitamina F) din ulei de cătină, ulei de nucă, ulei de măsline, floarea soarelui, margarină. Uleiul de cătină conține atât acizi grași saturați cât și nesaturați, conținutul lor depinzând de sursa uleiului (pulpă, semințe sau întregul fruct), tehnica de extracție a uleiului și condițiile de păstrare. Cei mai abundenți acizi saturați sunt palmitic (C16:0), stearic (C18:0) și miristic (C14:0). Unii dintre cei mai abundenți acizi nesaturați în uleiul de cătină sunt: palmitoleic (C16:1(n-7)), oleic (C18:1(n-9)), vaccenic (C18:1(n-7)), linolenic (C18:3(n-3)), α-linoleic (C18:2(n-6)) și miristoleic (C14:1(n-5)). Valoarea ridicată a acidului palmitoleic în fructe de cătină face ca uleiul să fie foarte folositor în cosmeticele destinate protecției pielii. Uleiul de pește se remarcă prin cantitate mare de acizi nesaturați superiori.

Măsurătorile GC-MS și HPLC efectuate au arătat modificări cantitative semnificative ale antioxidanților ca vitaminele E, F și steroli prin iradierea (la diferite doze kGy) cu electroni accelerați a uleiului de cătină, dar nu au arătat diferențe la iradierea în frunze la doze diferite kGy cu electroni accelerați. Optimizarea tratamentului de decontaminare a uleiului de cătină este necesară pentru a evita pierderea nutrienților importanți.

Analiza compoziției acizilor grași a arătat în medie 21% pentru acizii grași mononesaturați (MUFA), 24% pentru acizii grași saturați (SFA) și 53% pentru acizii grași polinesaturați (PUFA) (în cadrul MUFA, acizii 16:1 (cuprins între 5% și 8%) și 18:1ω9 (de la 14% la 21%) formează un procent considerabil din totalul de acizi grași. Speciile dominante ale SFA au fost 16:0 (în intervalul 15% - 30%) și 18:0 (cuprins între 6% și 9%). EPA (20:5ω3) și DHA (22:6ω3) au fost predominant PUFA, aflați în procent de 30%. Valorile ridicate ale MUFA în plasma de pește demonstrează înaltele calități nutritive ale peștelui.

De asemenea, a fost elaborată o metodă analitică sensibilă pentru determinarea aminoacizilor proveniți din plasmă, lapte sau probe de plante prin tehnica diluției izotopice (ID)-GC/MS. Metoda implică purificarea, prin tehnica de extracție cu schimbători de ioni, derivatizarea și analiza prin cromatografie de gaze-spectrometrie de masă (GC/MS). Un alt studiu a fost evaluarea diferențelor de aminoacizi liberi și seleniu din plasma în cazul dietei cu Se-metionină de 0,05 mg/Kg, în comparație cu plasma de control. Seleniul este un antioxidant, care oferă protecție împotriva daunelor produse de radicalii liberi. Este important să se determine nivelul de Se în plasmă. Majoritatea aminoacizilor liberi au avut o creștere în cele două varietăți de crap: Lausitz (L) și Galitian (O). Aminoacizii esențiali sunt: Arg, His, Leu, Ile, Lys, Met, Phe, Thr, Trp și Val. De asemenea aminoacizii liberi neesențiali au crescut în special în plasma de pește Galitian. Valorile minime ale seleniului din plasma de pește au arătat valori crescute pentru valorile experimentale în comparație cu valorile de control în varietățile de crap Lausitz (L) și Galitian (O) [34-36].

Metodele dezvoltate sunt precise și foarte folositoare în analiza aminoacizilor și acizilor grași din diferite medii biologice. Folosirea izotopilor marcați ca și standard intern permite determinarea precisă a aminoacizilor, respectiv acizilor grași și evitarea suprapunerii cu diferiți contaminanți. Metodele sunt foarte folositoare în controlul de nutrienți și în controlul alimentelor.

#### 4. Analiza de precizie ridicată pentru controlul alimentelor

Alimentele sunt produse în stare naturală sau prelucrate care conțin substanțe nutritive (organice și minerale), necesare organismului pentru întreținerea activității vitale. Calitatea alimentelor este un drept al consumatorilor cu efecte directe asupra vieții, iar problematica axată pe calitatea alimentelor se află permanent în centrul atenției organismelor constituite pentru garantarea siguranței acestora și pentru apărarea intereselor consumatorilor, în frunte cu cel mai de preț bun al acestora, starea de sănătate.

Prin diferite metode de analiză s-a demonstrat că materia vie este formată dintr-un număr aproape constant de elemente aflate în proporții procentuale diferite. Dintre acestea 99,9% sunt elemente care intră în alcătuirea tuturor celulelor vii (C, O, H, N, P, F, S, Si, Mg, Cl, K, Na și Ca), ele fiind numite *macroelemente*. Metodele moderne au pus în evidență și prezența altor bioelemente în organismele vii, dar care se găsesc în cantități mici, *microelemente*. Unele dintre aceste elemente sunt absolut necesare (Ca, Fe, Mg, Na, Co, Ni, Cu, Zn, Cr, Mo, Mn, V, Sn, Si, F, I, Se), altele posibil esențiale (Al, Ba, Sr, Rb, B, Li, Ge, Ti), tolerabile în anumite limite sau neesențiale (Sb, As, Ge, Hg, Cd, Pb, Au, Ag, Bi), lipsa lor putând fi substituită de prezența altora. Determinarea caracterului de "esențial" al unui element este deosebit de dificilă, iar procesele biologice dependente de ele, deosebit de variate ca funcție și complexitate. Utilizarea lor se face în cantități care variază de la ordinul gramelor la ordinul părților de milion (ppm  $10^{-6}$ ) sau părților de bilion (ppb  $10^{-9}$ ), de unde și denumirea lor de "macroelemente" și "urme de elemente".

Excesul sau deficitul de ioni metalici din organism explică multe afecțiuni chimice sau patologice, în timp ce concentrațiile intermediare sunt esențiale dezvoltării normale. De altfel, fiecare organism necesită o concentrație optimă dintr-un element dat, peste care sau sub care, nu se mai dezvoltă corespunzător. Acumularea unor metale din diverse alimente în unele organe, în tumori maligne și corelarea acestor date cu variațiile geografice ale frecvenței mortalității prin cancer, indică rolul important pe care l-ar putea avea factorul de mediu. Un subiect la ordinea zilei pentru enologia modernă îl reprezintă prezența în vinuri a metalelor. Dispersia substanțelor chimice folosite în viticultură, cum ar fi îngrășemintele și pesticidele, care duc la contaminarea mediului, precum și practica pivniței sărace, sunt factori importanți care afectează în mod direct conținutul de metale din vinuri.

Dezvoltarea metodelor adecvate pentru determinarea conținutului de metale din ape potabile și vinuri s-a realizat utilizând spectrometria de masă cu plasmă cuplată inductiv (ICP-MS). Această tehnică analitică este adecvată pentru determinări cantitative multielement la nivel de urme ( $\mu\text{g/l}$ ). O soluție multielementală poate fi analizată într-un minut, ceea ce face ca un număr mare de probe să poată fi analizate într-un timp foarte scurt, la limite de detecție joase, ajungând până la nivel de părți per trilion (ppt  $10^{-12}$ ). Procesul validării metodei pentru matricea de apă potabilă a implicat determinarea *parametrilor de performanță* ai metodei în conformitate cu Legea apei 311/2004 (drepte de regresie, LD, LQ, precizie, acuratețe) utilizând echipamentul indicat, lucrând corect și cu etaloane adecvate (tabelul 4.1 și 4.2). Pentru a fi îndeplinită condiția din legislație, criteriu de performanță (CP) =10% din CMA (concentrația maximă admisă). Criteriile de performanță stabilite pentru precizie sunt prezentate în tabelul 4.1 în conformitate cu legislația. Experimentările au constatat în analiza a 10 probe paralele, preparate separat, în baloane separate, în condiții de repetabilitate.

Datele din tabelele 4.1 și 4.2 arată că au fost îndeplinite criteriile de performanță stabilite (10% din etalon corespunzător fiecărui element) pentru precizie și acuratețe, în conformitate cu Legea 311/2004. Pentru



elementul Zn, parametrii de performanță ai metodei au fost impuși de analist, deoarece nu sunt specificați în Legea 311/2004.

**Tabel 4.1 Criteriu de performanță –Precizia în conformitate cu Legea 311/2004**

Parametru	Al (40µg/L)	Mn (3µg/L)	Ni (10µg/L)	Se (3µg/L)	Cd (3µg/L)	Pb (3µg/L)	Cr (3µg/L)	Cu (40µg/L)	Zn (40µg/L)
	37.603	2.999	10.102	3.129	2.968	2.911	2.684	39.048	42.963
	38.433	2.832	10.023	3.027	2.944	2.853	2.427	39.723	42.916
	38.959	2.834	10.120	2.724	2.939	2.729	2.380	38.352	42.798
	39.337	2.816	8.483	2.739	2.926	2.853	2.412	38.711	42.218
	38.559	2.679	8.250	3.153	2.901	2.872	2.234	39.019	42.484
	37.356	2.754	9.897	3.095	2.923	2.816	2.255	39.019	42.267
	39.887	2.717	9.067	3.205	2.864	2.940	2.294	37.238	39.967
	39.453	2.681	9.889	3.229	2.828	2.940	2.231	36.716	39.889
	40.121	2.719	9.779	2.733	2.841	2.889	2.282	39.402	39.660
	40.327	2.742	10.023	3.161	2.847	2.909	2.160	36.470	41.876
<b>X<sub>0</sub></b>	<b>39.003</b>	<b>2.777</b>	<b>9.563</b>	<b>3.019</b>	<b>2.898</b>	<b>2.871</b>	<b>2.336</b>	<b>38.370</b>	<b>41.002</b>
<b>s<sub>r</sub></b>	<b>1.016</b>	<b>0.097</b>	<b>0.701</b>	<b>0.206</b>	<b>0.049</b>	<b>0.064</b>	<b>0.149</b>	<b>1.152</b>	<b>1.332</b>
<b>rep (2,8*sr)</b>	<b>2.033</b>	<b>0.194</b>	<b>1.402</b>	<b>0.412</b>	<b>0.099</b>	<b>0.127</b>	<b>0.299</b>	<b>2.304</b>	<b>2.663</b>
<b>RSD %</b>	<b>2.606</b>	<b>3.487</b>	<b>7.331</b>	<b>6.820</b>	<b>1.700</b>	<b>2.217</b>	<b>6.393</b>	<b>3.002</b>	<b>3.248</b>
<b>CP precizie (µg/L)</b>	<b>4</b>	<b>0.3</b>	<b>1</b>	<b>0.3</b>	<b>0.3</b>	<b>0.3</b>	<b>0.3</b>	<b>4</b>	<b>4</b>
<b>DECIZIE</b>	<b>Admis</b>	<b>Admis</b>	<b>Admis</b>	<b>Admis</b>	<b>Admis</b>	<b>Admis</b>	<b>Admis</b>	<b>Admis</b>	<b>Admis</b>

**Tabel 4.2 Criteriu de performanță –Acuratețea în conformitate cu Legea 311/2004**

Parametru	Al (40µg/L)	Mn (3µg/L)	Ni (10µg/L)	Se (3µg/L)	Cd (3µg/L)	Pb (3µg/L)	Cr (3µg/L)	Cu (40µg/L)	Zn (40µg/L)
	37.603	2.999	10.102	3.129	2.968	2.911	2.684	39.048	42.963
	38.433	2.832	10.023	3.027	2.944	2.853	2.427	39.723	42.916
	38.959	2.834	10.120	2.724	2.939	2.729	2.380	38.352	42.798
	39.337	2.816	8.483	2.739	2.926	2.853	2.412	38.711	42.218
	38.559	2.679	8.250	3.153	2.901	2.872	2.234	39.019	42.484
	37.356	2.754	9.897	3.095	2.923	2.816	2.255	39.019	42.267
	39.887	2.717	9.067	3.205	2.864	2.940	2.294	37.238	39.967
	39.453	2.681	9.889	3.229	2.828	2.940	2.231	36.716	39.889
	40.121	2.719	9.779	2.733	2.841	2.889	2.282	39.402	39.660
	40.327	2.742	10.023	3.161	2.847	2.909	2.160	36.470	41.876
<b>x</b>	<b>39.003</b>	<b>2.777</b>	<b>9.563</b>	<b>3.019</b>	<b>2.898</b>	<b>2.871</b>	<b>2.336</b>	<b>38.370</b>	<b>41.704</b>
<b>val de ref</b>	<b>40.000</b>	<b>3.000</b>	<b>10.000</b>	<b>3.000</b>	<b>3.000</b>	<b>3.000</b>	<b>3.000</b>	<b>40.000</b>	<b>40.000</b>
<b>Acuratețea CP</b>	<b>0.997</b>	<b>0.223</b>	<b>0.437</b>	<b>0.019</b>	<b>0.102</b>	<b>0.129</b>	<b>0.664</b>	<b>1.630</b>	<b>1.704</b>
<b>acuratețe (µg/L)</b>	<b>4</b>	<b>0.3</b>	<b>1</b>	<b>0.3</b>	<b>0.3</b>	<b>0.3</b>	<b>0.3</b>	<b>4</b>	<b>4</b>
<b>DECIZIE</b>	<b>Admis</b>	<b>Admis</b>	<b>Admis</b>	<b>Admis</b>	<b>Admis</b>	<b>Admis</b>	<b>Admis</b>	<b>Admis</b>	<b>Admis</b>

Spectrometria de masă cu plasmă cuplată inductiv este o tehnică analitică adecvată pentru determinări cantitative și calitative multielement la nivel de urme (µg/L), din probe alimentare. Prezența unor elemente ca Al, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Rb, Sr, Ag, Cd, U poate influența procesul de vinificație sau poate schimba gustul și calitatea produsului final. În ceea ce privește validarea metodei, s-au obținut randamente de extracție între 80% și 100% pentru toate elementele, înregistrate în limitele teoretice. Se observă concentrații oarecum apropiate la soiurile care provin din aceeași regiune (Transilvania) și diferite de cele provenite din alte areale viticole [38].

Concentrațiile maxime admise pentru metalele toxice în vinuri sunt precizate în "Hotararea nr.1134/10.10.2002 pentru aprobarea Normelor Metodologice de aplicare a legii viei și vinului în sistemul organizării comune a pieței vitivinicole nr 244/2002". Toate probele de vin supuse analizelor prin ICP-MS prezintă un conținut de metale, care se încadrează în limitele maxime admise de legislația în vigoare. Un alt studiu s-a bazat pe analiza unui număr de 50 de probe de vin, de diferite soiuri, de la cele autohtone la cele de origine străină. În acest sens, am realizat o statistică în încercarea de a diferenția vinurile pe baza soiului și a regiunii de origine.

**Tabel 4.3 Concentrațiile de metale din probele de vinuri Românești**

Regiune	Sortiment de vin	Tipul de vin	Concentration (mg/L)									
			Al	Zn	Mn	Pb	Cu	Cd	Ni	Cr	Co	Sr
Vrancea	Vin de masă/ 2008	Sec-alb	1.61	0.75	1.25	0.09	0.34	0.0015	0.06	0.21	<lod	0.83
Vrancea	Vin de masă /2008	Demi-sec-alb	2.84	1.05	0.83	0.11	0.97	0.008	0.08	0.19	<lod	1.80
Iasi	Vin de masă /2008	Demi-sec-alb	1.66	0.80	1.29	0.04	0.09	0.006	0.06	0.15	<lod	0.35
Muntenia	Fetească Regală/ 2008	Sec-alb	1.89	0.95	1.49	0.08	0.35	0.005	0.08	0.17	<lod	0.44
Transilvania	Fetească albă/2005	Sec-alb	3.75	0.32	1.56	0.13	0.22	0.001	0.05	0.3	<lod	0.80
Transilvania	Riesling/2005	Sec-alb	2.70	0.23	1.71	0.1	0.44	0.0011	0.04	0.28	<lod	0.54
Transilvania	Traminer roz/2005	Demi-sec-alb	3.07	0.40	1.72	0.08	0.15	0.0021	0.05	0.19	<lod	0.50

**Tabel 4.4 Concentrația de metale din probele de vin în µg/L**

Regiune	Sortimentul de vin	Tipul de vin	Concentratia (µg/L)				
			Ag	Cd	Co	Ni	U
Dobrogea	Pinot Gris	alb	12.1	1.0	1.93	50.9	0.276
	Muscat Ottonel	alb	3.819	4.438	0.972	62.45	0.211
	Cardonary	alb	4.510	7.683	2.964	70.90	0.325
	Pinot Noire	roșu	3.099	5.2	2.533	49.534	0.943
	Mamaia	roșu	1.889	1.247	2.316	50.53	0.626
	Fetească Neagră	roșu	2.247	8.52	0.327	63.036	0.626
	Merlot	roșu	1.494	4.324	0.122	41.051	0.442
	Riesling Italian	alb	1.249	2.192	2.165	68.973	0.195
	Columna	alb	1.295	1.678	0.204	37.685	0.161
Cabernet Sauvignon	alb	0.356	3.14	0.13	32.574	0.503	

**Tabel 4.5 Concentrația de metale din probele de vin în mg/L**

Regiune	Sortimentul de vin	Tipul de vin	Concentratia (mg/L)						
			Al	Cr	Mn	Cu	Zn	Rb	Sr
Dobrogea	Pinot Gris	alb	2.137	0.226	1.141	0.195	0.667	1.283	0.750
	Muscat Ottonel	alb	2.051	0.262	1.346	0.086	0.561	1.794	0.893
	Cardonary	alb	2.571	0.260	1.211	0.113	0.800	1.810	0.801
	Pinot Noire	roșu	3.211	0.219	1.585	0.136	0.316	2.310	1.335
	Mamaia	roșu	2.187	0.247	1.480	0.020	0.360	2.178	1.245
	Fetească Neagră	roșu	1.921	0.245	1.274	0.095	0.247	0.521	0.643
	Merlot	roșu	1.535	0.213	1.200	0.126	0.312	0.845	0.523
	Riesling Italian	alb	2.433	0.294	1.374	0.107	0.430	1.223	0.647
	Columna	alb	2.153	0.224	1.050	0.071	0.414	1.011	0.388
Cabernet Sauvignon	alb	1.735	0.207	1.483	0.098	0.148	0.378	0.640	

Capacitatea de a distinge vinurile după regiunea lor de origine pe baza analizei urmelor de metale grele (oligoelemente) se datorează în principal migrării acestor elemente din sol în strugure și deci în produsul final, vinul. În esență, proba de vin analizată va reflecta geochimia solului de proveniență, putând furniza o amprentă a regiunii viticole de origine, luând în considerare pe lângă influențele mediului și a practicilor tehnologice, capacitatea de absorbție a plantei, care poate diferi în funcție de soiul de viță de vie.

De asemenea, s-a urmărit implementarea metodei analitice prin spectrometrie de masa cuplată cu cromatografie de gaze (GC-MS) pentru analiza compușilor organici volatili, în particular pesticide din vinuri, ca o alternativă la celelalte tehnici analitice, nivelul de detecție fiind superior altor metode, de ordinul ppb.

Studiu a fost aplicat pentru determinarea randamentului și detectarea SIM a pesticidelor din vin ca de exemplu penconazol (1), clorotalonil (2), folpet (3), propargite (4) și iprodion (5), dimetoat (6), având informații ca acestea sunt utilizate în stațiunea viticolă Jidvei. Ionii de bază au fost utilizați pentru modul de lucru SIM, prin selectarea ionilor din spectrelor de masă pentru determinarea reziduurilor de pesticide diferite (m/z 87) [39].

Rezultatele noastre au arătat valori mai mici decât 100µg/L pentru pesticidele testate, limita de detecție fiind de 10µg/L.

Compușii cu toxicitate mare sunt necesari a fi analizați la concentrații foarte mici. Analiza la nivel de urme include intervale de concentrație a poluanților de ng/kg și mai mici. Este important ca aceste concentrații joase să fie măsurate, deoarece concentrația poate fi ușor crescută în organism comparativ cu mediul în care acesta trăiește.

Alte alimente care pot suplimenta nutriția și pot oferi proprietăți terapeutice sunt sucurile naturale.

Amprenta sterolilor caracterizează sucurile naturale. Sterolii extrași din unele fructe: portocală, grapefruit, ananas sunt: colesterolul, campesterol, ergosterol, beta-stigmasterol, beta-sitosterol, isofucosterol și citostadienol. Compoziția cantitativă de *steroli*, în formă liberă sau legată, s-a folosit pentru caracterizarea diferitelor varietăți de citrice, incluzând grapefruit, portocala, Rangpur lime (singurul citric care conține ergosterol). Au fost raportați steroli liberi specifici la căpșuni și ananas. De asemenea se pot identifica compuși volatili. Principalul compus volatil a fost limonenul, extras din fructe de citrice. În cazul adulterărilor de

genul adaosurilor de sucuri mai ieftine la suc original, s-au selectat anumiți markeri. De exemplu pentru detecția adaosului de suc de portocale în suc de grapefruit, se utilizează ca marker un flavonoid, *naringin*. Pentru detecția adaosului de suc de mere la suc de pară, se utilizează aminoacidul *prolină* ca marker, fiind în concentrație mare în măr.

Metoda noastră prin GC-MS s-a utilizat pentru verificarea *autenticității* unor produse alimentare utilizând *biomarkeri* specifici [40, 41].

Sterolii cei mai importanți identificați sunt prezentați în tabelul 4.6. Raportul ariei picurilor față de un anume ion, pic de bază sau altul din spectru poate fi utilizat pentru o mai bună diferențiere între sucuri naturale și pentru evaluarea autenticității. Cei mai importanți steroli identificați sunt campesterol, beta-sitosterol și stigmasterol.

Sterolii au fost identificați în diferite citrice, inclusiv în grape. Există posibilitatea de a folosi steroli ca și indici de fructe. Ampretele cromatografice din diferite fructe diferă în funcție de concentrația de steroli, de aceea există variații între sterolii identificați în sucurile de portocale, grapefruit și sucurile de ananas. În sucurile de ananas a fost identificat *stigmastenona* la timpul de retenție al alfa-sitosterolului.

*Tabel 4.6. Caracteristicile spectrometrice de masă și cromatografice ale componentelor pentru diagnostic*

Tr (min)	Component (identificați)	M	Pic de bază m/z	Ioni caracteristici m/z(intensitate relativă,%)
11,3	valencene	204	161	91, 93 (65); 105, 107 (60) 133, 204 (50); 147, 189 (37)
14,6	nooklactone	218	147	79, 121 (84); 91, 133 (65) 105,175,203(56)
25,4	campesterol	400	400	315, 382, 367, 289 (50) 145, 213, 255 (30)
25,5	compus C	424	165	424(99), 203, 205 (20)
25.5	ergostanol	402	233	215 (80), 234, 402 (70) 397 (30)
25.7	stigmasterol	412	412	255, 271, 300 (50), 351 (33)
25.7	beta-sitosterol	414	414	329, 396 (50), 303, 381 (40)
26.0	izofucosterol	412	314	281 (34), 229, 299 (26)
26.7	alfa-sitosterol	412	412	
27.3	stigmastanol	416	233	416 (70), 215 (65),234, 401 (55)
28.2	stigmast-4-en-3-one	412	124	412 (80), 229 (60), 288, 289 (50)
28.3	citrostadienol	412	285	328 (40), 411, 313 (10), 426 (5)

Metoda elaborată pentru extracția și analiza unor compuși organici semnificativi (biomarkerii) în sucurile naturale utilizând metoda GC/MS este simplă, precisă și rapidă.

Metoda GC/MS dezvoltată este utilă în controlul autenticității sucurilor naturale cum sunt: suc de portocale, grepe și ananas. Această modalitate de analiză poate fi utilizată pentru controlul adulterărilor din industria alimentară (de exemplu adaos de suc de portocale în suc de grepe), verificarea sucurilor comerciale declarate naturale. Metoda ar putea fi, de asemenea, utilizată în controlul de alterare a sucurilor în industria alimentară.

Metoda prezentată este foarte ieftină în comparație cu alte metode de autentificare cum ar fi: spectrometria de masă în raport izotopic (IRMS) sau cromatografia de gaze chirală pentru evidențierea enantiomerilor, utilizate pentru autentificare.

## 5. Analiza de precizie ridicată pentru determinarea unor poluanți și alergeni

Apa este una din resursele economice cheie ale Europei, importanța sa fiind legată în primul rând de utilizarea ca resursă de apă potabilă, folosirea în domeniul industrial, casnic sau agricol. Majoritatea stațiilor de tratare a apei potabile de pe glob utilizează clorul ca agent de dezinfecție datorită eficienței sale crescute în a distruge microbii. Din păcate s-a observat că pe lângă avantajele sale în ceea ce privește obținerea apei potabile, prezintă și anumite dezavantaje precum formarea unor produși secundari de dezinfecție în urma interacției cu materia organică naturală (NOM) care posedă proprietăți toxice și cancerigene, cum sunt compușii din clasa trihalometanilor (THM). Cei mai întâlniți trihalometani sunt: clorofor-mul ( $CHCl_3$ ), bromodiclorometanul ( $CHBrCl_2$ ), bromoformul ( $CHBr_3$ ) și dibromoclorometanul ( $CHBr_2Cl$ ). Concentrația maximă admisă este 100 μg/l pentru totalul de THMs din apă potabilă, dată de Agenția de Protecție a Mediului USA (USEPA), iar din anul 1979 este mai jos de 80 μg/l și ar trebui considerată mai jos de 40 μg/l.

Compararea metodelor analitice [42]: headspace-GC-MS, headspace-GC-ECD, LLE-GC-MS și purge&trap-GC-MS pentru determinarea cantitativă a trihalometanilor în apa de băut a condus la alegerea metodei de extracție headspace pentru aplicații și monitorizare, fiind sensibilă și simplă. Înregistrarea și interpretarea spectrelor de masă și a poluanților din apa de băut a condus la stabilirea metodelor de analiză a THMs și a standardului intern. Au fost testați mai mulți compuși organici volatili pentru alegerea

standardului intern adecvat. Utilizarea halotanului ca etalon intern a permis simplificarea și în același timp creșterea preciziei metodei de analiză. În urma comparării metodelor de extracție lichid-lichid (LLE; utilizand ca solvent terț-butil eter), headspace și purge&trap, s-a ales metoda headspace pentru monitorizarea apelor, fiind mai simplă și ecologică, nefiind necesar să se utilizeze solvent pentru extracție.

Dezvoltarea metodelor analitice pentru determinarea THMs în apa de băut conduce la posibilitatea optimizării dezinfecției apei de băut încât să întrunească atât avantajul distrugerii microorganismelor din apă cât și prezența cât mai redusă a produșilor cancerigeni rezultați prin reacția compușilor organici cu clorul, ozonul sau alți agenți dezinfectanți. Optimizarea dozelor de clor sau ozon va conduce la îmbunătățirea calității apei, a sănătății și a vieții în țara noastră, la alinierea țării noastre la cerințele legislative europene, prin căutarea unor soluții alternative de dezinfectare a apei potabile (coagulare, sedimentare, utilizare de nanomembrane, ultrafiltrare, surse de apă alternative, îndepărtarea precursorilor de THMs din sursele de apă. Cele mai mari valori s-au obținut în anotimpul calduros, când cantitatea de compuși organici în ape este ridicată.

Validarea metodei de analiză cantitativă HS-GC-MS: Probele etalon cu 20, 40, 60, 80, 100, 200, 300  $\mu\text{g l}^{-1}$  THMs și 10  $\mu\text{g}$  halotan (SI) adăugat la fiecare probă, s-au extras și analizat, determinându-se dreptele de regresie.

Precizia (40 și 60  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) a dat R.S.D. 14.97-31.95 %, respectiv 17.93-25.49% iar acuratețea a dat pentru R.S.D. valori de 5.07-10.36% pentru proba etalon de 40  $\mu\text{g l}^{-1}$  și 6-32% pentru cea de 60  $\mu\text{g l}^{-1}$  LD a fost de 0.1  $\mu\text{g l}^{-1}$  și LQ de 1  $\mu\text{g l}^{-1}$ .

Corelația a fost foarte bună între metodele de extracție LLE-HS și HS-HS iar valorile măsurate în sistemul de distribuție au fost sub 100  $\mu\text{g l}^{-1}$ .

Metodele implementate de determinare a trihalometanilor din probe de apă utilizând tehnica spectrometrie de masă cuplată cu gaz cromatografie s-au dovedit a fi adecvate pentru identificarea rapidă de poluanți.

Metodele studiate sunt sensibile, precise și exacte, utile pentru determinarea THMs în apă de băut la nivelul concentrației maxime admise cerut de legislația română și europeană de 100  $\mu\text{g l}^{-1}$ . Metoda LLE-GC-MS este mai rapidă dar nu permite concentrarea extractului datorită posibilității pierderii analiților prin evaporare.

Metoda HS-GC-MS este avantajoasă deoarece nu utilizează solvent în procedura de extracție, este mai ieftină, ecologică, evită suprapunerea cu impurități din solvent (în special în cazul metodei HS-GC-ECD).

Metoda PT-GC-MS este extrem de utilă pentru determinarea impurităților din ape prin posibilitatea concentrării lor cu creșterea timpului de extracție și a debitului eluentului. Metodele HS și PT se pot automatiza.

Un alt factorul de mediu important este aerul, deoarece constituie suportul pe care are loc cel mai rapid transportul poluanților în mediu, astfel că supravegherea calității atmosferei este pe primul loc în activitatea de monitoring. Metalele grele sunt poluanți ai mediului, acestea fiind nondegradabile, toxice și persistente. Problemele asociate cu metalele grele din mediu au fost bine documentate și studiate. Metalele grele sunt compuși chimici care se acumulează la nivelul lanțului trofic producând modificări somatice și fiziologice, de multe ori ireversibile.

În acest sens s-a dezvoltat o metodă analiză multielementală, la nivel de urme  $\mu\text{g/L}$ , care se pretează pentru controlul metalelor toxice (Cd, Cr, Co, Pb, și Mn) din mediul înconjurător din pulberi în suspensie, imisii, și de asemenea s-a dezvoltat o metodă pentru optimizarea unui procedeu de extracție adecvat pentru determinare multielement a metalelor grele și a urmelor de pământuri rare din soluri și sedimente prin tehnica tehnica ICP-MS (tabelul 5.1).

De asemenea, am determinat calitativ treizeci de elemente, cu concentrații diferite variind de la 0.0005 mg/L la 300g/L. În ceea ce privește din metale ușoare valorile au fost obținute în limite mari, depășind chiar 11g/kg (tabelul 5.3).

**Tabel 5.1. LD și concentrațiile de metale din pulberile în suspensie colectate în perioada august-octombrie 2009 în zona industrială din Judetul Vâlcea, platforma Oltchim (2 prelevări/lună)**

Element	Limita de detecție LD ( $\text{ng/m}^3$ )	Concentrația metalelor din pulberi în suspensie fracția PM10 ( $\text{ng/m}^3$ ) în perioada august-octombrie 2009 (2 prelevări/lună)	
Ni	0.165	3.1437	2.896
		4.895	5.341
		6.7005	7.352
Cd	0.262	0.1361	0.1288
		0.563	0.977
		0.7943	1.0237
Cr	1.216	2.2629	2.678
		3.788	3.998
		8.7413	6.789
Co	0.148	0.3727	0.2556
		0.5006	0.6024
		0.5399	0.6234

<b>Pb</b>	4.292	18.6997	15.034
		27.7076	7.23
		4.8879	3.623
<b>Cu</b>	1.655	13.435	12.003
		17.4356	18.324
		29.4911	30.876
<b>Mn</b>	-	19.7501	18.659
		15.9634	16.012
		25.1578	22.189

Pentru a determina repetabilitatea pentru concentrațiile de metale am utilizat un material de referință certificat NCS ZC 73006 Standard Reference Material (SRM NCS ZC 73006). Deviația standard relativă are valori cuprinse între 0.4-3.94 mg/kg (tabelul 5.2). Precizia a fost determinată prin compararea concentrației măsurate cu valorile certificate și a fost exprimată ca procentaj al randamentului de recuperare R (%) [43].

**Tabel 5.2. Concentrația de metale (repetabilitate)**

Replici	Metale [mg/kg]											Cu
	As	V	Mn	Ni	Zn	Sr	Co	Ag	Rb	Pb	Li	
1	20.45	103.90	778.15	35.65	75.30	31.10	14.90	1.45	11.80	32.85	36.15	24.40
2	20.35	103.80	790.95	35.50	75.95	31.20	14.85	1.45	11.65	32.80	35.95	24.30
3	20.35	104.65	787.30	36.10	74.50	31.00	14.90	1.35	11.80	33.30	35.70	24.80
4	21.20	103.15	794.70	36.20	75.25	31.65	15.00	1.35	12.10	33.05	36.35	24.30
5	21.20	103.95	793.05	35.45	75.90	30.90	14.90	1.30	12.10	33.55	35.65	24.45
6	20.80	103.50	792.90	35.45	75.45	31.30	15.15	1.35	12.00	33.05	35.80	24.00
7	20.35	103.90	790.70	36.10	75.90	31.30	15.10	1.40	11.90	33.00	35.75	24.50
8	20.85	103.15	799.60	35.60	75.55	31.45	15.30	1.45	11.70	33.30	35.10	24.30
9	20.75	103.95	793.55	35.90	75.15	30.90	15.20	1.45	11.85	32.85	35.70	24.80
10	20.50	104.00	791.80	36.55	75.00	31.40	14.95	1.40	11.75	33.60	35.65	24.60
Media	20.68	103.79	791.27	35.85	75.39	31.22	15.02	1.39	11.86	33.13	35.78	24.44
SD	0.33	0.44	5.58	0.37	0.45	0.24	0.15	0.05	0.158	0.28	0.33	0.24
RSD %	1.61	0.42	0.70	1.05	0.60	0.79	1.02	3.94	1.33	0.87	0.93	1.00

**Tabelul 5.3. Conținut de metale în soluri din diferite regiuni Sălaj, Cluj și Târnița**

Element	Concentrația de metale [mg/kg]/Soluri									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Regiunea	Sălaj			Cluj				Tulcea		
Na	5298.9	5068.7	5003.8	11703.5	8137.0	11231.1	8213.6	1.5	1.5	1.3
Mg	96.1	85.4	111.1	4909.0	4855.3	2453.1	1729.3	0.5	0.5	0.5
Al	10494.8	10542.4	10047.9	12048.9	9942.9	20123.5	21479.5	1.1	1.1	1.09
Si	275547.9	246352.5	281397.0	143985.6	145282.9	199099.9	166766.4	0	0	0
P	242.4	334.5	270.7	483.4	515.8	427.07	380.03	894.4	1046.8	935.6
K	3470.6	3436.6	3126.8	1317.3	1656.8	7767.4	7167.04	0	0	0
Ti	2404.3	2812.8	2556.9	6867.2	6565.8	2716.9	2965.4	1.1	1.1	1.1
V	22.3	33.8	23.2	220.4	189.2	69.1	73.5	57.6	60.0	42.2
Cr	27.6	34.7	19.7	71.7	90.8	47.0	53.7	0	0	0
Mn	294.7	252.4	278.8	769.6	720.4	306.5	377.8	0.7	0.7	0.7
Fe	6067.6	9440.4	7097.8	33578.6	29300.6	16719.9	17237.0	0	0	0
Co	5.3	4.6	4.4	34.6	31.8	11.3	11.7	12.6	12.3	10.1
Ni	9.9	12.4	7.7	42.3	42.9	18.6	24.3	1.6	1.6	26.5
Cu	4.4	5.9	4.08	49.1	40.3	29.8	18.2	2.0	2.0	6.7
Zn	16.6	21.7	17.7	71.9	76.2	49.0	47.3	61.3	100.0	45.3
As	5.3	7.09	5.9	8.2	11.3	8.5	10.7	28.0	35.5	18.2
Sr	24.4	25.8	26.6	30.5	24.2	24.2	21.8	0.6	0.6	0.6
Rb	11.3	8.5	12.9	2.9	2.4	12.9	12.9	15.9	9.7	14.1
Zr	84.9	90.1	71.6	37.06	32.5	53.9	84.6	83.5	78.1	61.4
Mo	0.3	0.3	0.2	0.4	0.5	0.7	0.7	1.4	1.8	0.7
Ag	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0.4	0.4	0.4	0.2
Cd	0.07	0.03	0.02	0.3	0.3	0.2	0.1	0.2	0.5	0.1
In	2.8	0.1	0.09	2.7	0.1	2.8	0.3	0.7	0.3	0.3
Sn	0.9	1.5	0.8	1.3	1.9	4.3	4.2	42.4	22.4	4.8
Sb	0.4	0.6	0.5	1.8	1.1	1.8	0.8	0.9	2.4	0.7
Ba	148.4	157.2	144.1	174.7	73.3	213.1	227.2	0.7	0.7	0.7
La	0.2	0.8	0.3	2.7	1.7	3.7	5.8	7.1	6.8	4.9
Ce	10.8	7.5	12.8	16.0	12.4	12.9	18.1	21.5	23.7	18.4
Pr	0.1	0.4	0.1	1.23	0.7	1.3	2.1	2.3	2.4	1.4
W	1.6	1.2	1.05	0.5	1.2	3.08	3.6	1.6	2.5	1.6
Pt	0.03	0.02	0.01	0.01	0.006	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01
Au	0.09	0.09	0	0.07	0.1	0.08	0	1.02	0.2	0.6

<b>Hg</b>	0.05	0.1	0.08	0.07	0.1	0.09	0.2	0.4	0.3	0.1
<b>Tl</b>	0.2	0.2	0.2	0.09	0.09	0.6	0.6	0.3	0.4	0.2
<b>Pb</b>	14.4	16.3	14.6	6.7	37.6	27.1	25.02	17.9	36.2	14.1
<b>Bi</b>	0.05	0.09	0.05	0.04	0.2	0.2	0.2	0.1	0.4	0.1
<b>Th</b>	0.6	0.6	0.6	0.2	0.18	1.01	1.8	2.8	3.3	0.9
<b>U</b>	0	0	0	0	0	0	0	1.8	0	1.3

Concentrațiile au fost obținute în conformitate cu limitele permise pentru soluri conform Ordinului 756-1997 pentru Sb, Ag, Ba, Cd, Mn, Mo, Zn. În ceea ce privește de metale toxice, pentru unele soluri din diferite zone limitele admise se depășesc, situându-se în apropierea pragurilor de alertă sensibile (V- zona Cluj; Sn-zona Tulcea).

O serie de parametri au fost luați în considerare și evaluați pentru validarea metodelor, și anume: liniaritate, limită de detecție, limită de determinare cantitativă, precizie și acuratețe.

Valorile recomandate privind randamentul de extracție s-au obținut pentru toate metodele de extracție cu microunde a materialului de referință certificat. Cea mai bună metodă de extracție a fost considerată mixtura de 3 acizi (  $\text{HNO}_3 + \text{HCl} + \text{HF}$ ). O serie de parametri au fost luați în considerare și evaluați pentru validare metodei pe soluri și sedimente: limita de detecție a variat între (0.0001 - 0.07) mg/kg pentru cele 13 metale studiate; liniaritate bună (factorul de corelație  $0.9999 \geq R \geq 0.996$ ), rezultatele în procente pentru randamentul de recuperare sunt bune (80% -110% de recuperare) pentru majoritatea elementelor studiate. Deviația standard relativă a avut valori cuprinse între 0.4-3.94 mg/kg. Pentru a determina repetabilitatea pentru concentrațiile de metale am utilizat un material de referință certificat NCS ZC 73006 Standard Reference Material (SRM NCS ZC 73006). Deviația standard relativă are valori cuprinse între 0.4-3.94 mg/kg.

Rezultatele raportate evidențiază faptul că procedura extracție este o parte esențială în procedura de măsurare a metalelor din soluri, sedimente, pulberi în suspensie și alimente.

Analiza compușilor alergeni a devenit extrem de importantă în ultimii ani, datorită creșterii numărului persoanelor alergice asociat probabil cu creșterea poluării și a stresului. Comitetul Științific pentru Cosmetice și alte Produse non-alimentare (SCCNFP) al Comisiei Europene a constituit recent o lista care cuprinde 26 de substanțe considerate alergene (tabel nr. 5.11). Directiva a Uniunii Europene (Directiva 2003/15/CE, Jurnalul Oficial al Uniunii Europene, L66/26, 11.3.2003) specifică faptul că la produsele comercializate (parfumuri, cosmetice) oricare dintre aromele potențial alergene care sunt în compoziția produsului și care sunt sub incidența prevederilor referitoare la etichetare (de exemplu, în cazul în care concentrațiile acestora depășesc 0,01% de greutate) se vor trece pe lista de ingrediente. Metoda analitică cea mai indicată pentru precizie și acuratețe în cazul compușilor volatili este tehnica GC-MS.

Determinarea calitativă și cantitativă a alergenilor prezenți în diferite uleiuri volatile, parfumuri (odoranți de interior, after shave), detergenți și săpunuri, s-a făcut utilizând diferite tehnici de extracție și analiza prin GC/MS.

S-a urmărit identificarea și determinarea unor alergeni volatili din 3 tipuri de săpun (Pink Rose, Lilac Violet și Onur), detergent lichid Pur, after shave Adidas, odoranți de mașină din comerț și uleiuri de trandafir, folosind cuplajul cromatografie de gaze-spectrometrie de masă (GC/MS). Metoda de analiză a constatat în separarea prin cromatografie de gaze a compușilor extrași din produsele enumerate mai sus urmată de identificarea și determinarea cantitativă a acestor compuși. Pentru cele 3 săpunuri am folosit metoda de extracție headspace.

În probele de săpun Violet Lilac au fost identificați componenții alergeni, linaloolul fiind alergenul care depășește cantitatea maximă admisă. În cazul săpunului Pink Rose s-a determinat o cantitate mai mare de linalool. Cu toate acestea pe eticheta săpunului erau trecuți toți alergenii identificați de noi. S-a constatat că produsele din comerț nu prezintă întotdeauna pe etichetă prezența alergenilor, așa cum cere legislația în vigoare menționată.

S-a realizat și un studiu comparativ de alergeni determinați în parfumuri odorizante. S-a observat că limonenul și linaloolul sunt în cantitățile cele mai mari, iar pentru alergenii determinați în uleiuri de trandafir de proveniențe diferite, din Ucraina, Moldova și Bulgaria, s-a observat că geraniolul este în cantitățile cele mai mari, component cu un miros foarte plăcut.

Metodele de extracție utilizate și metoda de analiză GC/MS pentru alergenii conținuți în produse cosmetice sunt metodele potrivite pentru acest tip de identificari. Un avantaj îl constituie consumul redus de solvent în cazul injectării directe, iar în cazul metodelor de extracție headspace și SPME analiza este ecologică, se face fără consum de solvent.

Se constată prezența alergenilor studiați atât în produși cosmetici sau de parfumerie cât și în cei alimentari. Așadar metoda poate fi utilizată pentru testarea componenților volatili alergeni din alimente, plante, medicamente și produse cosmetice.

Sensibilitatea metodei a fost adecvată pentru determinarea compușilor alergeni din produsele analizate. Determinarea compușilor volatili alergeni prin tehnici de analiză performante și etichetarea produselor este un subiect de mare interes pentru prevenirea efectelor acestora în cazul subiecților sensibili.

## 6. Concluzii

Metodele ICP-MS și GC/MS sunt precise și exacte, importante în studiul calității produselor alimentare, farmaceutice și în controlul poluanților mediului înconjurător.

Cuplajul GC-MS întrunește calitățile deosebite ale celor două aparate, separare ideală prin gaz-cromatograf și identificare ideală prin spectrometrul de masă.

Tehnicile ID-MS și ID-GC/MS, utilizând compuși marcați cu izotopi stabili, sunt tehnici fizice performante de analiză cantitativă la nivel de urme de mare precizie, cu numeroase posibilități aplicative interdisciplinare. Folosirea compușilor marcați cu izotopi stabili face posibilă evitarea contaminanților prezenți în probe.

Tehnica ICP-MS are capacitatea de analiză calitativă și cantitativă multielementală care poate fi realizată destul de rapid în comparație cu alte tehnici complementare. Datorită sensibilității sale superioare, ICP-MS este o metodă aleasă pentru cele mai multe determinări de oligoelemente.

Selectivitatea și specificitatea foarte bună a cele 2 spectrometre de masă dau precizie și exactitate ridicată analizelor. Prin identificarea de mare precizie a componentelor la timpul de eluție cromatografic al analitului (analizelor), prin testarea permanentă în timpul analizei a identității componentelor, metoda spectrometriei de masă este unică, specifică, selectivă, extrem de prețioasă și de neînlocuit.

Este necesar controlul continuu și obiectiv al rezultatelor analitice prin validarea metodelor de analiză cantitativă atât pentru a demonstra că metoda este corectă și corespunde scopului propus cât și pentru a verifica dacă analistul a lucrat corect.

Metodele ICP-MS și GC-MS sunt utile în analiza nutrienților (alimente, băuturi, suplimente nutritive, vitamine, oligoelemente).

Determinarea biomoleculilor de interes terapeutic a presupus efectuarea unor analize calitative și cantitative pretențioase care urmăresc determinarea până la nivel de nanograme sau picograme a unor compuși de interes.

S-au stabilit metode de analiză pentru studiul compoziției unor compuși bioactivi prin spectrometrie de masă (MS) cuplată cu cromatografie de gaze (GC-MS) din uleiuri volatile utilizate în alimentație (vermut, biter, floratonic, mentă, angelica archangelica, mușețel, urzică, melisa) și caracterizarea unor compuși de aromă a unor uleiuri volatile utilizate în tratament (aromoterapie: trandafir, lavandă, busuioc). S-au stabilit metode optime de extracție a compușilor activi cu acțiune terapeutică. Studiile pentru obținerea unor metode de extracție cât mai eficiente a compușilor organici dintr-o matrice biologică sunt de mare importanță. În acest sens s-a urmărit ca metodele să aibă randament de extracție ridicat, precizie și consum mic de solvenți și de timp. Pentru stabilirea metodei de extracție optime s-au comparat: metoda de extracție lichid-lichid (LLE) cu două metode diferite de extracție pe fază solidă (SPE pe 300 mg RP-18 silicagel legat de C-18 și SPE pe 300 mg TCS sau „amestec de faze”), metoda de extracție prin microunde (MWE) și extracția prin ultrasunete (USE), utilizandu-se un amestec etalon de compuși organici în cantitate cunoscută. Procedura de extracție nu trebuie să afecteze structura moleculară a compușilor. Identificarea compușilor organici din plante este importantă deoarece separarea și cunoașterea structurii lor chimice constituie pasul esențial în explicarea acțiunii lor terapeutice caracteristice.

Metodele sunt adecvate pentru determinarea la nivel de urme a compușilor de aromă din extractele de plante. Comparația între cele 4 metode de extracție s-a dovedit utilă pentru caracterizarea compușilor bioactivi din plante. S-a observat că un ulei volatil are mai mulți compuși principali dintre care unul este caracteristic, compus de bază, care dă savoarea și aroma uleiului.

S-au analizat comparativ compușii bioactivi din diferite sorturi de plante aparținând aceleiași specii. Diferențele cantitative și calitative care se observă se pot datora diferitelor soiuri, procedurilor de uscare, climei, modului de păstrare, etc. Comparația între diferitele metode de extracție s-a dovedit utilă pentru caracterizarea compușilor bioactivi din plante medicinale.

GC-MS se dovedește a fi o tehnică utilă pentru caracterizarea extractelor de flavonoizi obținuți din plantele studiate ca și compuși nederivați. Compararea diferiților solvenți din punct de vedere al flavonoizilor a arătat faptul că hexanul și butanolul sunt cei mai nepotriviți solvenți pentru acești compuși. S-a dovedit că

acetona sau solvenții aromatici, metil etil cetona și acetatul etil au capacitate redusă de extracție. Cei mai buni solvenți au fost alcoolii, în special metanolul și izopropanolul.

Au fost elaborate metode de extracție, separare cromatografică și identificare de spectre a unor uleiuri vegetale (cătină, ulei de măsline, nucă, margarină, ulei de pește) și analiza cantitativă a acizilor grași metilați din plasmă de pește (FAME) și a altor nutrienți prin GC-MS. Metodele dezvoltate pentru analiza acizilor grași din diferite medii biologice au avut o precizie bună. Valoarea ridicată a acidului palmitoleic în fructe de cătină face ca uleiul să fie foarte folositor în cosmeticele destinate protecției pielii. Valorile ridicate ale MUFA în plasma de pește demonstrează înaltele calități nutritive ale peștelui. De asemenea, a fost elaborată o metodă analitică sensibilă pentru determinarea seleniului și aminoacizilor proveniți din plasmă, probe de plante și lapte prin tehnica diluției izotopice (ID)-GC/MS și ICP-MS. Metodele sunt folosite în controlul de nutrienți și în controlul alimentelor.

ICP-MS este o tehnică de analiză multielement, adecvată pentru analiza alimentelor, care permite controlul unor compuși toxici din produse alimentare (vinuri și apă) la nivel de  $\mu\text{g/L}$ , oferind o mare selectivitate, sensibilitate și limite de detecție extrem de joase față de alte tehnici complementare (ICP-AES sau AAS). De asemenea, pentru controlul pesticidelor din vinuri au fost dezvoltate metode de extracție și analiză prin tehnica GC-MS, utilizând tehnici de extracție comparative lichid-lichid (LLE) și extracție pe fază solidă (SPE).

S-a dezvoltat o metodă prin GC-MS pentru verificarea *autenticității* unor produse alimentare utilizând *biomarkeri* specifici. Analiza *amprentei sterolilor* poate da informații asupra adulterărilor sau prezenței anumitor sucuri de fructe în băutura preparată.

Metodele implementate de determinare a trihalometanilor din probe de apă utilizând tehnica GC-MS s-au dovedit a fi adecvate pentru identificarea rapidă de poluanți. Metoda HS-GC-MS este avantajoasă deoarece nu utilizează solvent în procedura de extracție, este mai ieftină, ecologică, evită suprapunerea cu impurități din solvent (în special în cazul metodei HS-GC-ECD).

S-a dezvoltat o metodă analiză multielementală, la nivel de urme  $\mu\text{g/L}$ , care se pretează pentru controlul unor metale toxice (Cd, Cr, Co, Pb, și Mn) din mediul înconjurător din pulberi în suspensie, imisii.

S-a dezvoltat o metodă pentru optimizarea unui procedeu de extracție adecvat pentru determinare multielement a metalelor grele și a urmelor de pământuri rare din soluri și sedimente prin tehnica ICP-MS.

S-a urmărit identificarea și determinarea unor alergeni volatili din 3 tipuri de săpun (Pink Rose, Lilac Violet și Onur), detergent lichid Pur, after shave Adidas, odorizanți de mașină din comerț și uleiuri de trandafir, folosind cuplajul cromatografie de gaze - spectrometrie de masă (GC/MS). În concluzie s-a constatat prezența alergenilor studiați atât în produse cosmetice sau de parfumerie cât și în produse alimentare. Determinarea compușilor volatili alergenicici prin tehnici de analiză performante și etichetarea produselor este un subiect de mare interes pentru prevenirea efectelor acestora în cazul subiecților sensibili. S-a constatat că produsele din comerț nu prezintă întotdeauna pe etichetă prezența alergenilor, așa cum cere legislația în vigoare menționată.

Tehnicile ICP-MS și GC/MS sunt tehnici fizice performante de analiză cantitativă la nivel de urme de mare precizie, cu numeroase posibilități aplicative interdisciplinare.



## Bibliografie selectivă

- [1] L. Jantschi, *Chimie Fizică Analize Chimice și Instrumentale*, Academic Direct, Cluj-Napoca, Cap. 6, 72-96, 2004
- [2] I. Lavagnini, F. Magno, R. Seraglia, P. Traldi, *Quantitative application of mass spectrometry*, John Wiley & Ltd., Cap 2, 37-54, 2006
- [3] I. Lavagnini, F. Magno, R. Seraglia, P. Traldi, *Quantitative application of mass spectrometry*, John Wiley & Ltd., Cap. 2-3, 37-107, 2006
- [4] M. Culea, *Spectrometrie de masă. Principii și aplicații*, Risoprint, Cluj-Napoca, Cap.1-6, 7-276, 2008
- [5] M. McMaster, C. McMaster, *GC/MS A practical User's Guide*, Wiley VCH U.S.A, Cap. 1-3, 3-40, 1998
- [6] H. J. Hubscmann, *Handbook of GC/MS. Fundamentals and Applications*, Wiley-VCH, Second Completely Revised and Updated Edition, Cap. 3, 293-415, 2009
- [7] M. Culea, E. Culea, *Metode fizice de analiza*, Risoprint, Cluj-Napoca, Cap. 9, 111-150, 2004
- [8] S. Gocan, S. C. Cobzac, *Metode moderne de prelucrare a probelor organice*, Risoprint, Cluj-Napoca, Cap. 1-5, 5-48, 2004
- [9] P.C. Meier, R. E. Zund, *Statistical Methods in Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons Inc., New York, 94-132, 2000
- [10] European Pharmacopoeia 5.0, 1535-1536, 2005
- [11] I. Gh. Tanase, A. Pană, G. L. Radu, M. Buleandra, *Validarea metodelor analitice. Principii teoretice și studii de caz*, Printech, Cap. 3, 310-503, 2007
- [12] C. Liang, W. Li, B. Xia, Y. Liu X. Yu, *Chemistry of Natural Compound*, 46, 4, 656-657, 2010
- [13] J. Rudback, K. Zohrevand, L. Hagvall, B-A. Persson, U. Nilsson, A.-T. Karlberg, *Journal of Environmental Monitoring*, Feb.2011 (for review only)
- [14] E. Gille, D. Daniilă, M. Hanceanu, *Romanian Biological Sciences*, 4, 3-4, 21-32, 2006
- [15] M. D. Sokovic, J. Vukojevic, P. D. Marin, D. D. Brkic, V. Vajs, L. J. K. D. Van Griensven, *Molecules*, 14, 238-249, 2009
- [16] C. Liang, W. Li, B. Xia, Z. Liu, X. Yu, *Chemistry of Natural Compounds*, 46, 4, 2010
- [17] E. Derwich, Y. Benziane, A. Boukir, L. Benaabidate, *Chem. Bull. Politehnica Univ. Timisoara*, 54, 68, 2, 2009
- [18] S. S. Kim, J. S. Baik, T. H. Oh, W. J. Yoon, N. H. Lee, C. G. Hyun, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72, 10, 2507-2513, 2008
- [19] H. Hafedh, B. Abdallah, S. Meiji, N. Emira, B. Amina, *African Journal of Microbiology Research*, 4, 11, 1122-112, 2010
- [20] J. N. C. Chowdhury, Nandi, M. Uddin, M. Rahman, *Bangladesh J. Sci. Ind. Res.*, 42, 1, 79-82, 2007
- [21] B. J. Seok, S. S. Kim, J.A. Lee, T. H. Oh, J.Y. N H.Lee, C. Gu. Hyun, *Journal of Microbiol. Biotechnol.*, 18, 1, 74-79, 2008
- [22] N. Kalogeropoulos, A. Chiou, A. Mylona, M. Ioannou, N. K. Andrikopoulos, *Food Chemistry*, 100, 509-517, 2007
- [23] S. Nicoară, M. Culea, N. Palibroda, O. Cozar, *Indoor Environm.*, 3, 83-86, 1994
- [24] H. J. Vandenburg, A. A. Clifford, K. D. Bartle, J. Carroll, I. Newton, L. M. Garden, J. R. Dean, C. T. Costley, *Analyst*, 122, 101-105, 1997
- [25] C. Gherman, M. Culea, C. Onuc, *Talanta*, 53, 253-262, 2000
- [26] **A. Iordache**, M. Culea, O. Cozar, *"Chemické listy" Journal*, 102, s667-669, 2008
- [27] **A. Iordache**, M. Culea, O. Cozar, *Journal of Physics: Conference Series*, 182, 1-5, 012027, 2009
- [28] C. Mesaros, M. Culea, **A. Iordache**, O. Cozar, C. Cosma, *Bulletin USAMV, Agriculture*, 66, 1, 547-548, 2009
- [29] **A. Iordache**, M. Culea, G. Gherman, O. Cozar, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B*, 267, 338-342, 2009
- [30] **A. Iordache**, M. Culea, O. Cozar, *Processes in isotopes and molecules, PIM-2009, Cluj-Napoca (JPCS)*, 26-28 septembrie, 2009
- [31] C. Mesaros, M. Culea, **A. Iordache**, O. Cozar, *Bulletin USAMV, Agriculture*, 66, 1, 111-117, 2009
- [32] **A. Iordache**, R. Minea, M. Culea, C. Lehene, *Chemické listy Journal*, 102, s663-664, 2008
- [33] C. Mesaroș, **A. Iordache**, M. Culea, C. Crăciun, O. Cozar, R. Fechet, E. Culea, *Studia Universitatis Babeș-Bolyai, Physica*, 2, 26-32, 2009
- [34] C. Pop, L. Bara, E. Horj, **A. Iordache**, C. Laslo, M. Culea, *Bulletin of USAMV, Agriculture*, 67, 2, 373-377, 2010
- [35] **A. Iordache**, E. Horj, A. Rodica Ani, C. Mesaros, S. Morar, O. Cozar, M. Culea, *AIP*, 1262, 192-197, 2010
- [36] **A. Iordache**, M. Culea, E. Horj, O. Cozar, *"Romanian Journal of Physics"* (acceptată 2011)
- [37] **A. Iordache**, I. Geană, R. Ionete, M. Culea, *Progress of Criogenics and Isotopes Separation*, 13, 1, 137-145, 2010

- [38] **A. Iordache**, I. Geana, E. Horj, C. Pop, R. Ionete, *Bulletin of USAMV, Cluj-Napoca, Agriculture*, 67, 2, 500-510, 2010
- [39] **A. Iordache**, M. Culea, C. Lehene, O. Cozar, *Studia Universitatis Babeş-Bolyai, Physica, LIII*, 2, 47-56
- [40] **A. Iordache**, M. Culea, O. Cozar, *Chemické listy Journal*, 102, s665-666, 2008
- [41] M. Culea, **A. Iordache**, O. Cozar, *Progress of Cryogenics and Isotopes Separation*, 21+22, 27-30, 2008
- [42] M. Culea, **A. Iordache**, O. Cozar, D. Ristoiu, *Journal of Environmental Protection and Ecology- JEPE*, 10(2), 342-350, 2009
- [43] C. Voica, A. Dehelean, **A. Iordache**, Irina Geana, *Romanian Reports in Physics*, (acceptată 2012)
- [44] M. Culea, **A. Iordache**, O. Cozar, *Journal of Environmental Protection and Ecology- JEPE*, 11, 2, 523-528, 2010