



**UNIVERSITATEA „BABES-BOLYAI”  
CLUJ-NAPOCA  
FACULTATEA DE FIZICĂ**



**Rezumatul Tezei de Doctorat  
Studii asupra unor compuși biologici activi și  
toxici prin metode spectroscopice**

**CONDUCĂTOR DE DOCTORAT,  
Prof. Univ. Dr. Monica CULEA**

**DOCTORAND,  
Niculina Sonia PĂUN (căs. ȘUVAR)**

**CLUJ-NAPOCA  
2019**

# CUPRINSUL TEZEI

Introducere .....	5
CAPITOLUL I SPECTROMETRIA DE MASĂ.....	9
1.1. Istoric.....	9
1.2. Introducere în spectrometria de masa.....	10
1.3. Spectrometrul de masă .....	12
1.3.1. Principii de funcționare. ....	12
1.3.2. Sistemul de introducere a probei .....	13
1.3.3. Surse de ioni. Tehnici de ionizare .....	14
1.3.4. Analizoare de masă .....	18
1.3.5. Tipuri de detectori și performanțele spectrometrelor de masă.....	25
1.4. Determinarea maselor prin tehnica spectrometriei de masă.....	31
CAPITOLUL II CROMATOGRAFIA DE GAZE .....	32
2.1. Istoric.....	32
2.2. Introducere în cromatografia de gaze.....	34
2.3. Părți componente (Instrumentar).....	35
2.3.1. Componenta de injecție a probei .....	35
2.3.2. Gazul purtător.....	36
2.3.3. Tipuri de coloane în cromatografia de gaze .....	37
2.3.4. Parametrii coloanei. Elemente caracteristice cromatografiei. ....	39
2.3.5. Sisteme de detecție .....	42
CAPITOLUL III APLICAȚII MODERNE ALE SPECTROMETRIEI DE MASĂ – TANDEMUL GC-MS, RESPECTIV ICP-MS .....	49
3.1. Cuplajul cromatografie de gaze - spectrometrie de masă (GC-MS) .....	49
3.2. Tehnologia ICP-MS (spectrometrie de masă cu plasma cuplată inductiv) .....	52
CAPITOLUL IV VALIDAREA METODELOR DE ANALIZĂ .....	56
4.1. Terminologie .....	56
4.2. Criterii de validare.....	56
CAPITOLUL V ANALIZA PRIN GC-MS A AMINOACIZILOR ȘI A ACIZILOR GRAȘI DIN SEMINȚE DE PORUMB .....	59
5.1. Introducere .....	59
5.2. Obiectivul studiului .....	61

5.3. Materiale și metode – parte experimentală.....	62
5.3.1. Reactivi și probe.....	62
5.3.2. Reacții de derivatizare.....	62
5.3.3. Aparatura experimentală.....	63
5.3.4. Calcul cantitativ al aminoacizilor.....	63
5.3.5. Calculul cantitativ al acizilor grași.....	65
5.4. Rezultate și discuții.....	66
5.4.1. Determinarea aminoacizilor.....	66
5.4.2. Determinarea acizilor grași.....	72
5.5. Concluzii.....	76
<b>CAPITOLUL VI DETERMINAREA ACIZILOR GRAȘI ÎN PLASMA ȘI CARNE DE PĂSTRĂV PRIN GC-MS.....</b>	<b>77</b>
6.1. Obiectivul studiului.....	77
6.2. Materiale și metode.....	78
6.3. Aparatura experimentală.....	79
6.4. Calculul cantitativ al acizilor grași.....	79
6.5. Rezultate și discuții.....	80
6.6. Concluzii.....	85
<b>CAPITOLUL VII COMPARAREA COMPOZIȚIEI DE NUTRIENȚI DIN UNELE ULEIURI VEGETALE.....</b>	<b>86</b>
7.1. Obiectivul studiului.....	86
7.2. Materiale și metode.....	89
7.3. Rezultate și discuții.....	90
7.4. Concluzii.....	97
<b>CAPITOLUL VIII. ANALIZA COMPARATIVĂ A CONȚINUTULUI DE ACIZI GRAȘI ȘI METALE DIN EXTRACTE DE SEMINȚE.....</b>	<b>98</b>
8.1. Obiectivul studiului.....	98
8.2. Materiale și metode.....	99
8.3. Rezultate și discuții.....	100
8.4. Concluzii.....	107
<b>CAPITOLUL IX. CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE.....</b>	<b>109</b>
9.1. Concluzii.....	109
9.2. Contribuții personale.....	110
9.2.1. Contribuții teoretice.....	111
9.2.2. Contribuții aplicative.....	111

BIBLIOGRAFIE .....	114
LISTA LUCRĂRILOR REPREZENTATIVE PUBLICATE ÎN STRĂINĂTATE ȘI ÎN ȚARĂ .....	126
DEFINIȚII ȘI ABREVIERI UTILIZATE IN CONȚINUTUL TEZEI.....	128

**Cuvinte cheie:**

- Spectrometrie de masă (MS), Cromatografie de gaze (GC), cuplaj GC-MS, metode de analiză cantitativă
- Aminoacizi, acizi grași, calcul cantitativ, linii consangvinizate
- Analiza FAME, PUFA, EFA, SFA
- Uleiuri vegetale, semințe, carne și plasmă de păstrăv, calitate nutrițională, conținut metale grele
- ICP-MS, oligoelemente, Omega 3, Omega 6

## INTRODUCERE

Cunoașterea în detaliu a proceselor chimice care au loc în structura organismelor vii, atât din regnul vegetal cât și animal, a devenit posibilă numai odată cu dezvoltarea tehnicilor de analiză instrumentală moderne. Aceste tehnici permit astăzi obținerea unui număr foarte mare de date, concomitent cu reducerea timpilor necesari etapelor de colectare, identificare și interpretare.

Cromatografia de gaze (GC) reprezintă în prezent una dintre cele mai importante metode analitice atunci când vorbim despre determinarea substanțelor individuale din amestecuri complexe, în cadrul analizelor chimice organice. Spectrometria de masă (MS), utilizată ca metodă de detecție, oferă posibilități remarcabile de determinare calitativă și cantitativă a compușilor, mergând până la ordinea în care se leagă grupările în moleculă. Dintre cele mai importante caracteristici ale spectrometriei de masă putem enumera: sensibilitatea ridicată, limitele de detecție superioare, timpul redus necesar și aplicabilitatea metodei într-o varietate largă de domenii: chimie organică, controlul alimentelor și al poluării mediului, investigații criminalistice, monitorizarea proceselor, fizica atomului, cinetica reacțiilor, analize specifice chimiei anorganice, etc.

Aplicațiile metodelor analitice în industria alimentară sunt multiple și deosebit de importante. Studiile actuale urmăresc dezvoltarea și optimizarea unor metode capabile să determine compoziția unor alimente utilizate pe scară largă (amprenta cromatografică/metabolomică), să identifice anumiți compuși esențiali pentru funcționarea optimă a metabolismului sau sistemului imunitar uman, sinteza proteinelor, menținerea echilibrului mineral, etc. Alte studii urmăresc creșterea productivității unor cereale / legume sau fructe, dezvoltarea unor specii de hibridi rezistenți la diferite condiții de mediu, cu valoare nutritivă superioară și de mare randament.

Aminoacizii sunt substanțe organice cu importanță fiziologică, componente de bază a proteinelor, elemente indispensabile în alimentația fiecărui om. Pot fi considerați pe bună dreptate cei mai importanți nutrienți din organismul uman, contribuind la sinteza și utilizarea eficientă a proteinelor. Din multitudinea de aminoacizi cunoscuți astăzi în natură (peste 700), 20 de aminoacizi sunt utilizați în sinteza a peste 50.000 proteine unice și 20.000 de enzime necesare. Dintre acești 20 de aminoacizi, se disting 9 aminoacizi esențiali pe care corpul nu îi poate sintetiza singur și care se obțin consumând diverse alimente. Organismul uman nu stochează surplusul de aminoacizi esențiali, aceștia fiind folosiți pentru crearea de noi proteine, în mod regulat. Din acest considerent, furnizarea continuă a acestor aminoacizi este necesară pentru menținerea stării de sănătate.

Celălalt tip de aminoacizi, cei neesențiali, pot fi sintetizați de organism, astfel încât nu este necesar consumul lor regulat.

Acizii grași reprezintă componente importante ale lipidelor, prezente în plante, animale și microorganisme. De regulă, aceștia sunt grupări carboxilice, cu o catenă alifatică lungă, majoritatea având un număr par de atomi de carbon. Dacă legăturile carbon-carbon sunt toate

unice, acidul este saturat; dacă oricare dintre aceste legături sunt duble sau triple, acidul este nesaturat, prezentând o reactivitate crescută. Acizii grași nu se regăsesc în stare liberă în natură, ci în combinație cu glicerolul, formând trigliceridele. O serie de acizi grași sunt considerați esențiali, deoarece aceștia nu pot fi sintetizați de către organismul animal sau uman. Astfel de acizi, cum ar fi omega-3 și omega-6, sunt necesari în procesele celulare, dar și la sinteza unor alți acizi grași. Acizii grași omega-3 și omega-6 sunt derivați din acidul linoleic, respectiv alfa-linoleic. Aportul de acizi omega-3 și omega-6 este deci deosebit de important pentru menținerea unei sănătăți optime.

Evoluția în timp a obiceiurilor alimentare a condus la modificarea consumului de acizi grași, caracterizată prin creșterea aportului de alimente bogate în acizi grași omega-6 și reducerea alarmantă a aportului de omega-3, ceea ce a condus la un dezechilibru important al raportului omega-6 / omega-3, acesta având repercusiuni grave asupra metabolismului uman, și respectiv asupra stării de sănătate.

Acizii grași esențiali omega-3 se regăsesc în surse vegetale: semințe ale unor cereale / legume, uleiuri extrase din acestea, sau în carnea de pește (macrou, hering, păstrăv). Omega-6 se regăsește în compoziția semințelor și în nuci, dar și în uleiurile extrase din acestea, în special în uleiurile vegetale rafinate. Spre deosebire de omega-3, omega-6 este produs în diferite cantități și în organismul uman, având ca și cauză principală dezechilibrul hormonal.

Determinarea mineralelor și a oligoelementelor prezintă de asemenea un interes important. Unele metale (Fe, Mg, Zn și Cu) sunt considerate micronutrienți esențiali pentru organism. Din acest considerent, prezența unor metale în alimentație (în particular, în uleiurile vegetale) reprezintă un factor important de evaluare a proprietăților biochimice și nutritive, având în vedere capacitatea acestora de a influența viteza de oxidare. Alte metale, cunoscute și sub denumirea de metale grele, prezintă un rol nociv asupra alimentelor contaminate. Contaminarea alimentelor se poate face din apă, aer, sol, contactul cu mașini, instalații sau utilaje tehnice, etc. Toxicitatea acestor metale este rezultatul legării lor de sistemele enzimice importante prezente în celula animală sau de părți ale membranelor celulare. Efectul toxic se manifestă la depășirea unor valori prag, sub care unele (Cu, Co, Fe, Ni, Zn) pot avea chiar rol benefic, esențial pentru proteinele implicate în anumite căi metabolice.

La depășirea limitelor maxime admisibile, unele metale grele (As, Hg, Pb, Cd) pot cauza necroza tubulilor renali, afectarea funcției renale, în timp ce expunerea cronică la Pb, Hg, Cd conduce la efecte nefrotoxice.

Calitatea nutritivă a conținutului de metale, în cadrul studiilor efectuate pe parcursul stagiului de doctorat, a fost testată folosind tehnica spectrometriei de masă cu plasmă cuplată inductiv (ICP-MS), cu ajutorul instrumentului Perkin Elmer ICP-MS.

Unele minerale (Ca, Na, Mg, K, Zn) au fost determinate din probele de semințe prin spectrometrie de absorbție atomică cu flacără, utilizând un instrument Analytik Jena, ContraAA 700, în flacără de amestec acetilenă-aer.

**Scopul tezei** constă în dezvoltarea unor metode analitice și în optimizarea sistemelor GC-MS (gaz cromatograf cuplat cu spectrometru de masă), în vederea determinării acizilor grași și a aminoacizilor din extracte de semințe, din diferite uleiuri vegetale, în plasmă și carne de păstrăv,

elaborarea metodelor de analiză și comparare a compoziției de nutrienți, precum și determinarea conținutului de metale grele, prin spectrometrie de masă cu plasmă cuplată inductiv (ICP-MS).

### ***Structura tezei***

Teza de doctorat este structurată în 8 capitole, un capitol introductiv, un capitol prezentând Concluzii și Contribuții personale, respectiv o parte conținând referințele bibliografice utilizate în redactarea lucrării.

**Primul capitol** cuprinde o descriere a spectrometriei de masă, ca fiind una dintre cele mai importante metode și tehnici utilizate în analiza cantitativă, cu aplicabilitate într-o sferă largă de domenii: fizică atomică, fizica și cinetica reacțiilor chimice, majoritatea domeniilor analitice. Sunt prezentate noțiuni teoretice privind principiile de funcționare, principalele sisteme de introducere a probei, sursele de ioni, respectiv tipurile de detectori utilizați în domeniul spectrometriei de masă, în funcție de domeniul de analiză și de performanțele impuse.

**Capitolul II** tratează, din punct de vedere teoretic, cea mai răspândită metodă de analiză cromatografică, gaz cromatografia, metodă utilizată la scară largă în prezent pentru analize cantitative și calitative ale amestecurilor, în scopul purificării compușilor, analiza fluxurilor de gaze, determinarea procentelor de oxigen, azot, dioxid și monoxid de azot, inclusiv în medicină (analize de sânge), determinarea și analiza uleiurilor esențiale sau a aromelor și nutrienților, în industria alimentară. Sunt de asemenea prezentate principalele tipuri de coloane cromatografice, precum și sistemele de detecție utilizate, cu aplicațiile specifice fiecăruia.

**Capitolul III** tratează succint două aplicații moderne ale spectrometriei de masă, respectiv cuplajul gaz cromatograf – spectrometru de masă (GC-MS) și spectrometrul de masă cu plasmă cuplată inductiv (ICP-MS).

Cuplajul gaz cromatograf – spectrometru de masă (GC-MS) reprezintă o tehnică analitică extrem de utilă atunci când este aplicată pentru confirmarea și identificarea analiților volatili și semivolatili dintr-un amestec complex, la determinarea masei moleculare și a structurii elementare a unor volatili / semivolatili necunoscute, etc.

Metoda ICP-MS se bazează pe combinarea plasmăi cuplate inductiv, ca metodă de ionizare, cu spectrometria de masă, ca metodă de separare și detecție a ionilor. Pe lângă probele clasice de sol, apă, hrană, actualmente o gamă largă de probe biologice, atât solide, cât și lichide, pot fi analizate prin ICP-MS: sânge, urină, plasma, ser, fluide interstițiale, organe interne, dinți, păr, oase și chiar celule.

**Capitolul IV** prezintă procesul de validare a metodelor de analiză, adică demersul prin care se stabilește, prin studii de laborator, dacă o metodă îndeplinește criteriile pentru aplicațiile analitice pentru care a fost selectată. Validarea constă într-o metodologie de conformare / acreditare care ia în considerare scopul, caracteristicile, performanțele și limitele de acceptanță, elemente caracterizate printr-o serie de parametri, prezenți de asemenea în acest capitol.

Primele patru capitole pregătesc baza teoretică pentru analizele efectuate în demersul științific din partea a doua a tezei de doctorat.

**Capitolul V** prezintă o analiză calitativă și cantitativă utilizând cuplajul cromatografie de gaze – spectrometrie de masă, în vederea identificării aminoacizilor și a acizilor grași din 25 de probe de semințe de porumb. Studiul a fost realizat în vederea sporirii productivității producției



de porumb și dezvoltării de hibridi rezistenți la diferite condiții de mediu, cu valoare nutritivă superioară și de mare randament.

**Capitolul VI** cuprinde analize de precizie ridicată, cu scopul comparării conținutului de acizi grași în plasma și carnea de păstrăv (*Oncorhynchus mykiss*). În acest sens, a fost dezvoltată o metodă simplă și de încredere, prin care acizii grași au fost separați și identificați cu ajutorul unui gaz cromatograf Trace GC, echipat cu o coloană capilară RTX-5MS, cuplat cu un spectrometru de masă cuadrupolar Trace DSQ.

**Capitolul VII** prezintă o metodă de determinare și comparare a compoziției de nutrienți (acizi grași și ionii metalelor) prezente în diferite uleiuri vegetale, extrase din semințe de: in, mac, struguri, cânepă, nuci, soia, dovleac, susan, și compararea valorilor obținute cu cele identificate în carnea de păstrăv. Identificarea și măsurătorile concentrațiilor de acizi grași au fost efectuate prin GC-MS, iar pentru caracterizarea conținutului de ioni metalici (Na, Mg, K, Mn, Cd, Cu, Cr), a fost utilizată tehnica ICP-MS (spectrometrie de masă cu plasmă cuplată inductiv).

**Capitolul VIII** prezintă analize de precizie pentru determinarea conținutului de acizi grași, minerale și metale grele, din extracte de semințe de: in, mac, struguri, cânepă, nucă, dovleac, susan, pepene verde și chia. Metodele analitice utilizate la aceste determinări au fost de asemenea cuplajele GC-MS, respectiv ICP-MS.

**Capitolul IX** încheie teza prin prezentarea concluziilor finale, precum și a contribuțiilor personale aduse prin prezenta lucrare. Sunt subliniate viitoarele direcții de cercetare posibil de urmat, utilizând rezultatele obținute experimental, prin intermediul acestei teze de doctorat.

## ***1. Analiza prin GC-MS a aminoacizilor și a acizilor grași din semințe de porumb***

### ***Obiectivul studiului***

În cadrul acestui studiu am urmărit dezvoltarea unei metode de analiză calitativă și cantitativă a aminoacizilor și acizilor grași din 25 de probe de semințe de porumb. Studiul a fost realizat în vederea sporirii productivității producției de porumb și dezvoltarea de hibridi rezistenți la diferite condiții de mediu, cu valoare nutritivă ridicată și de mare randament.

Am analizat mai multe linii consangvinizate de semințe de porumb, cu scopul de a ajuta la îmbunătățirea culturii [1],[2]. Consangvinizarea se obține întotdeauna prin inseminare artificială, fiind practic imposibil de realizat liniile consangvine printr-o alta metodă.

Cantitățile de proteine și de aminoacizi sunt influențate de factori genetici și de mediu cum sunt condițiile climatice, tipul de sol, cantitatea de fertilizator utilizată, etc. Cercetarea în vederea îmbunătățirii calității nutritive este necesară pentru obținerea unui conținut adecvat de aminoacizi în furaje, deoarece în mod obișnuit porumbul conține cantități reduse de aminoacizi esențiali, cum ar fi metionină, lizină, treonină sau altele care pot limita creșterea animalelor de fermă [3].

Cromatografia de gaze cuplată cu spectrometria de masă GC-MS reprezintă o tehnică excelentă pentru identificarea și determinarea cantitativă a aminoacizilor și acizilor grași [4],[5],

acest considerent constituind și motivul alegerii acestei tehnici pentru analiza calitativă și cantitativă a aminoacizilor liberi din probele de porumb, în cadrul acestui studiu.

### *Materiale și metode*

Pentru analiza calitativă și cantitativă a aminoacizilor și acizilor grași, au fost utilizate 25 probe constând în semințe de porumb. Liniile consangvinizate studiate reprezintă nucleul a 5 soiuri de semințe de porumb: TC 209 (1.1), TC 316 (2.1), TC 243 (3.1), TB 367 (4.1), D 105 (5.1), experimentat cu 5 tipuri de citoplasmă: originală, (CIT T 248), (CIT TB 329), (CIT TC 177) și (CIT TC 221). Liniile consangvinizate de porumb s-au notat : 1,2-1,5; 2,2-2,5; 3,2-3,5; 4,2-4,5; 5,2-5,5.

A fost extrasă o cantitate de 400 mg făină de porumb, cu 5 ml de acid tricloracetic ( $C_2HCl_3O_2$ ) 6%, într-o baie de ultrasunete, timp de 5 minute, procesul de extracție fiind repetat de 2 ori. Probele au fost centrifugate timp de 5 min, la 6000 rot/min, colectându-se supernatantul. 0,5 ml din acest supernatant și 10  $\mu$ l metionină [ $^{15}N$ ] folosită ca standard intern, au fost trecute printr-o rășină schimbătoare de ioni Dowex 50W-W8, coloana 4x40 mm. Soluția colectată a fost uscată în curent de azot la temperatura de 60°C sau utilizând o centrifugă cu vid la 60°C [2].

### *Derivatizarea aminoacizilor*

Analiza compușilor prin GC/MS se aplică pentru compuși volatili și semivolatili. Există însă un număr mare de compuși care sunt prea puțini volatili pentru a putea fi analizați prin cromatografie de gaze și spectrometrie de masă. Prin utilizarea unor procedee chimice componenții de interes pot fi modificați astfel încât să devină mai volatili.

Analiza aminoacizilor prin cromatografie de gaze-spectrometrie de masă presupune adesea derivatizări multiple.

În cazul studiului experimental pentru aminoacizi, derivatizarea a inclus o esterificare a funcției carboxil prin adăugare de 200  $\mu$ l butanol/ HCl 3M timp de 1 ora la 110 °C, urmată de o acetilare a funcției amină folosind 100  $\mu$ l anhidridă trifluoracetică, timp de 20 min la 60°C. Reacția de trifluoroacetilare are ca rol reducerea polarității grupării amino. Solvenții în exces au fost îndepărtați cu un curent de azot, iar componenții derivatizați uscați au fost dizolvați în 500  $\mu$ l de acetat de etil și injectați în GC-MS.

### *Derivatizarea acizilor grași*

Probele de acizi grași au fost convertite în esterii metilici corespunzători (FAME), în scopul aplicării analizei GC. Ca agent de esterificare s-a folosit metanol:clorură de acetil 4:1 (v:v). Procesul de esterificare a avut loc timp de 20 minute, la temperatura de 80°C. Excesul de reactiv s-a îndepărtat prin evaporarea în flux de azot, la temperatura de 60°C, esterii metilici obținuți fiind apoi dizolvați în 500 $\mu$ l diclormetan. După adăugarea standardului intern (10 $\mu$ g C11:1), 1 $\mu$ l de probă a fost injectată automat în gaz-cromatograf.

### *Aparatură experimentală*

În vederea separării și identificării aminoacizilor și acizilor grași s-a utilizat un cromatograf de gaze Trace GC, cuplat cu un spectrometru de masă cu analizor cuadripolar Trace

DSQ Thermo Finnigan (fig. 1.1). Separarea s-a realizat pe o coloana capilară Rtx-5MS, 30m lungime, 0,25 mm diametru, grosimea filmului de fază solidă 0,25  $\mu\text{m}$ .



**Figura 1.1.** Sistemul Thermo Finnigan Trace GC-Thermo DSQ

Programul de temperatură pentru separarea aminoacizilor a pornit de la 70°C timp de 2 min, crescând apoi cu o viteză de 5°C /min până la 100°C, apoi cu 10°C /min până la 260°C, iar apoi cu 17°C /min până la 290°C, această temperatură fiind menținută timp de 5 min.

Pentru separarea acizilor grași, s-a utilizat următorul program de temperatură: 50°C, 1 min, creștere succesivă cu 8°C/min până la 300°C. Debitul de heliu (gazul purtător) a fost de 1 ml/min.

Condițiile de funcționare a spectrometrului de masă au fost aceleași pentru ambele tipuri de compuși investigați: temperatura liniei de transfer: 250°C, temperatura injectorului: 200°C, temperatura sursei de ioni: 250°C. Energia electronilor a fost de 70 eV, iar curentul de emisie de 100 mA. Ca standarde interne s-au folosit <sup>15</sup>N-metionina pentru determinarea cantitativă a aminoacizilor, respectiv acidul undecaenoic (C11:1), pentru determinarea cantitativă a acizilor grași.

#### *Calculul cantitativ al aminoacizilor*

Pentru identificarea și determinarea cantitativă a aminoacizilor, se utilizează metoda diluției izotopice. Se adaugă un standard intern marcat izotopic, analog al aminoacidului de interes, de regulă <sup>15</sup>N-metionina, în fiecare probă de supernatant, rezultate în urma extracției. Abundențele izotopice fracționale ale metioninei și ale izotopomerului său marcat cu <sup>15</sup>N au fost calculate din rapoartele izotopice determinate experimental.

Contribuțiile izotopice se pot descrie prin intermediul unui set de ecuații liniare simultane, cu forma generală:

$$I_x = \sum_{x=i,j} A_i X_j \quad (1)$$

unde  $I_x$  reprezintă abundența izotopică relativă a ionului  $x$ ,  $A_i$  reprezintă contribuția fiecărei specii izotopice la fiecare masă din domeniul înregistrat, iar  $X_j$  este abundența fracțională necunoscută.

Dacă exprimăm setul de ecuații simultane în notație matricială, abundența relativă a fiecărei specii izotopice ( $A_i$ ) este calculată pentru cei doi ioni  $m/z$  171 și  $m/z$  172:

$$I = AX \quad (2)$$

unde :  $A$  – matricea abundenței ( $m \times n$ ), conținând contribuția fiecărei specii izotopice,  $I$ -intensitatea măsurată;  $X$  – cantitatea de compus.

Soluția setului de ecuații este obținută prin metoda celor mai mici pătrate, astfel:

$$X = (A^T A)^{-1} A^T I \quad (3)$$

unde:  $A^T$  – transpusa matricei  $A$ .

Matricea pseudo-inversă,  $A^{-1}$ , se calculează cu ajutorul formulei:

$$A^{-1} = \frac{1}{\det A} A^* \quad (4)$$

unde  $A$  este matricea determinant iar  $A^*$  este adjuncta matricei  $A$ .

Factorii de răspuns pentru fiecare aminoacid (coeficienți adimensionali folosiți la corecția răspunsului dat de detector) se calculează cu relația:

$$F_i = \frac{A_i/A_j}{m_i/m_j} \quad (5)$$

unde:  $m_i$  este cantitatea corespunzătoare compusului  $i$ ,  $m_j$  este cantitatea corespunzătoare compusului  $j$ , iar  $A_i$  și  $A_j$  sunt ariile compușilor  $i$  și  $j$ .

Aminoacizii din probele de semințe de porumb au fost calculați cu ajutorul formulei:

$$C_i (\% \text{masă}) = \frac{\frac{m_j \cdot A_i}{F_i \cdot A_j}}{\sum_{i=1}^n \left( \frac{A_i}{F_i} \right)} * 100 \quad (6)$$

unde  $C_i$  este cantitatea de compus  $i$ ,  $m_j$  este cantitatea de standard intern,  $A_i$  și  $A_j$  sunt ariile picurilor  $i$  și  $j$ , iar  $F_i$  este factorul de răspuns corespunzător compusului  $i$ .

#### *Calculul cantitativ al acizilor grași*

În vederea determinării cantitative a acizilor grași, am utilizat ca standard intern, după derivatizare, 10  $\mu\text{g}$  de acid undecaenoic (C11:1).

Calculul cantitativ al acizilor grași s-a realizat utilizând următoarea formulă:

$$F_i = \frac{A_i/A_j}{m_i/m_j} \quad (7)$$

$$m_i (\mu\text{g}) = m_j (\mu\text{g}) \frac{A_i}{F_i \cdot A_j} \quad (8)$$

unde:  $F_i$  – factorii de răspuns calculați cu ajutorul standardelor de acizi grași,

$m_i, m_j$  – cantitățile corespunzătoare compușilor  $i$ , respectiv  $j$ ;

$A_i, A_j$  – ariile compușilor  $i$ , respectiv  $j$ .

#### **Rezultate**

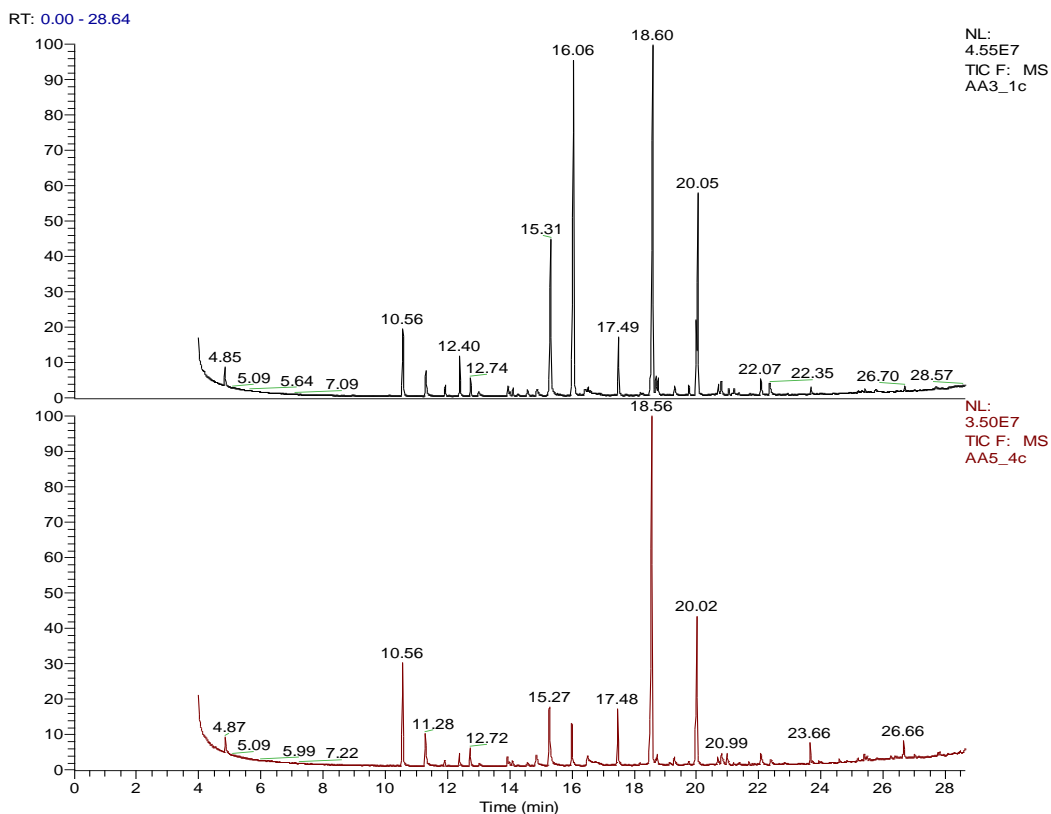
##### *Determinarea aminoacizilor din probele de semințe de porumb*

Identificarea aminoacizilor din liniile consangvinizate de extracte de semințe de porumb studiate s-a realizat utilizând biblioteca de spectre NIST. Astfel, au fost identificați 17 (șaptesprezece) aminoacizi, conform tabelului 1.1:

**Tabelul 1.1.** Aminoacizii identificați în liniile consangvinizate de extracte de semințe de porumb.

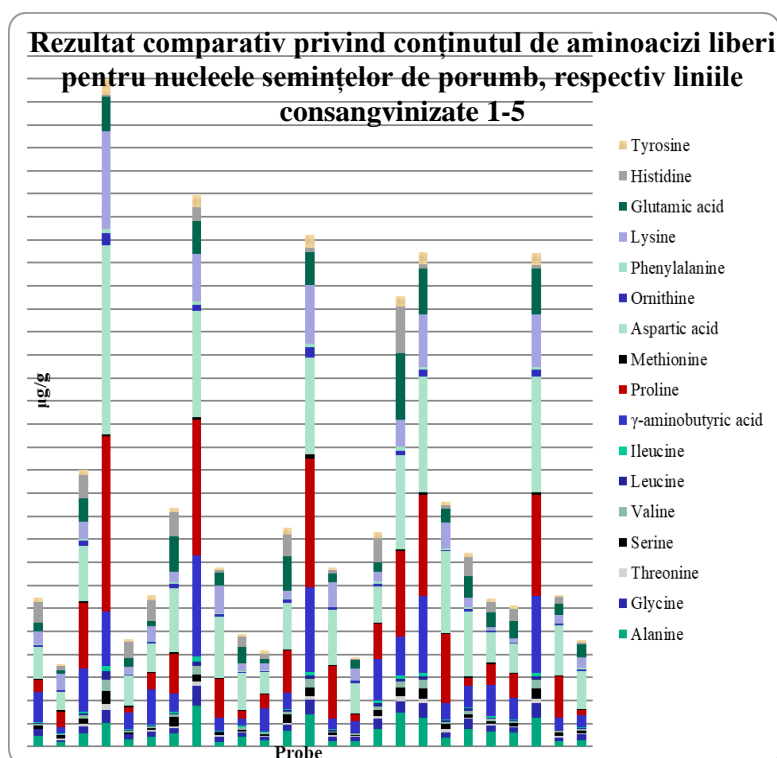
<b>Nr. crt.</b>	<b>Componentă identificată</b>	<b>Timpul de reținere cromatografic (min)</b>
1	Alanina (Ala)	10,56
2	Glicina (Gly)	11,28
3	Threonine (Thr)	11,92
4	Serina (Ser)	12,38
5	Valina (Val)	12,72
6	Leucina (Leu)	13,94
7	Isoleucina (Ile)	14,09
8	Gamma-aminobutyric acid (GABA)	15,27
9	Prolina (Pro)	16,01
10	Methionina (Met)	17,48
11	Acidul aspartic (Asp)	18,60
12	Phenylalanina (Phe)	18,70
13	Ornithina (Orn)	18,75
14	Tyrosina (Tyr)	19,75
15	Lysina (Lys)	19,98
16	Acid glutamic (Glu)	20,03
17	Histidina (His)	22,35

Cromatogramele de separare a aminoacizilor liberi din două soiuri de semințe de porumb din linii consangvinizate, 3.1 și 5.4. : (Ala: 10,56 min, Gly: 11,28 min, Ser: 12,38 min, Val: 12,72 min, GABA: 15,27 min, Pro: 16,06 min, Met: 17,48 min, Asp: 18,6 min, Lys: 19,98 min, Glu: 20,03 min, His: 23,35 min), sunt prezentate în figura 1.2. Comparația dintre totalul de aminoacizi liberi este prezentată în fig. 1.3. Barele reprezintă totalul rezultatelor aminoacizilor liberi pentru nucleele semințelor de porumb TC 209 (1.1), TC 316 (2.1), TC 243 (3.1), TB 367 (4.1), D 105 (5.1) și totalul rezultatelor aminoacizilor liberi pentru liniile consangvinizate din semințele de porumb 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, obținute în experimentele TC 209 (1.1), cu tipurile citoplasmice: 2 (CIT T 248), 3 (CIT TB 329), 4 (CIT TC 177) și 5 (CIT TC 221) și așa mai departe; 1.1 este comparat cu semințele 1.2, 1.3, 1.4 și 1.5; 2.1 cu 2.2-2.5; 3.1 cu 3.2-3.5; 4.1 cu 4.2-4.5; 5.1 se compară cu semințele 5.2- 5.5.



**Figura 1.2.** Compararea variației aminoacizilor liberi din două tipuri de semințe (linii consangvinizate) de porumb, 3.1 și 5.4

Valorile cele mai mari pentru numărul total de aminoacizi liberi au fost obținute pentru linia consangvinizată 3 urmată de 2, 4, 1 și 5.



**Figura 1.3.** Comparația dintre totalul de aminoacizi liberi din liniile consangvinizate de porumb 1-5

Rezultatele valorilor aminoacizilor din liniile de semințe de porumb consangvinizate, în  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , pentru nucleul semințelor sunt prezentate în tabelul 1.2 și în fig. 1.4. pentru liniile de semințe consangvinizate.

**Tabelul 1.2.** Valorile aminoacizilor liberi, în  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , în nucleul semințelor

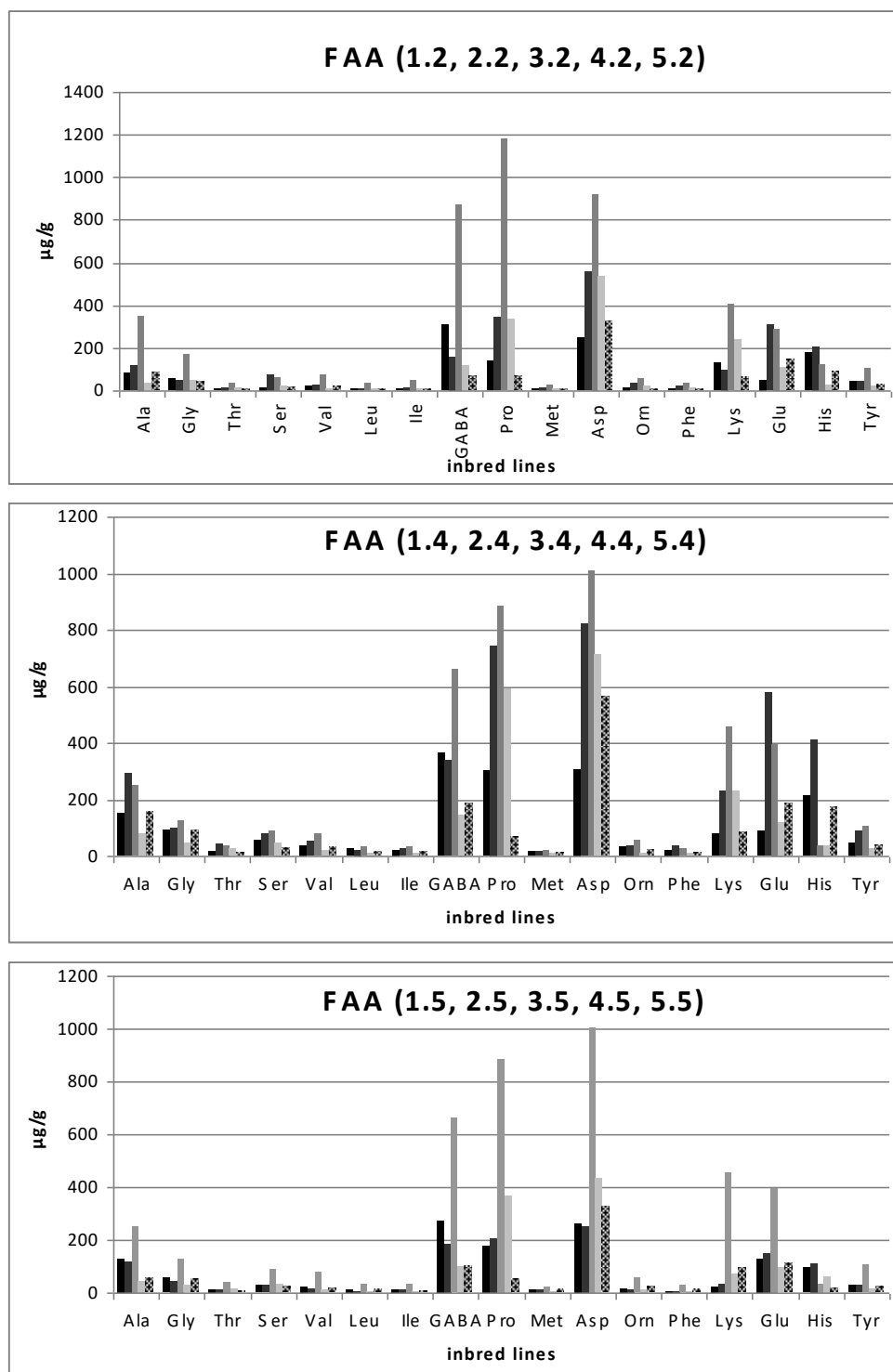
rf	1.1	2.1	3.1	4.1	5.1
Ala	94,36±18,16	40,23±8,30	112,17±16,51	207,05±27,04	64,66±9,88
Gly	53,56±3,34	17,15±0,73	64,09±10,88	110,56±10,85	38,53±6,56
Thr <sup>1</sup>	6,55±0,24	8,40±2,07	17,06±4,02	53,39±7,21	3,85±0,21
Ser	23,2±8,55	31,47±6,31	51,75±14,90	113,23±5,55	12,35±3,19
Val <sup>1</sup>	19,37±2,05	7,45±1,29	27,85±3,47	96,21±8,59	13,23±0,27
Leu <sup>1</sup>	7,53±0,93	3,29±0,73	12,86±2,04	72,80±14,28	9,10±0,12
Ile <sup>1</sup>	7,54±1,08	3,65±0,72	13,85±0,54	48,14±1,04	6,75±0,81
Pro	100,84±12,57	140,50±24,25	569,22±93,61	1522,20±165,37	50,22±2,38
Met <sup>1</sup>	10,25±0,92	11,72±0,11	16,63±0,15	16,94±1,05	9,89±1,88
Asp	280,32±39,11	155,14±17,66	483,75±127,60	1642,84±260,53	261,27±73,59
Orn <sup>1</sup>	15,47±2,84	14,88±3,19	40,46±1,63	102,62±13,95	8,05±2,51
Phe <sup>1</sup>	6,96±2,12	3,48±0,81	18,60±2,12	39,14±9,46	7,01±0,36
Lys <sup>1</sup>	113,10±1,53	142,06±30,20	149,33±44,05	845,47±87,43	64,77±7,48
Glu	72,47±4,29	30,55±1,59	202,87±56,70	305,95±63,99	75,74±21,68
Tyr	40,21±1,95	14,05±2,99	44,10±10,08	136,09±12,08	25,34±4,07
His <sup>1</sup>	177,78±80,68	37,96±17,01	204,04±83,11	15,03±5,13	139,49±10,65
total	1293,29	713,44	2404,68	5798,44	933,87
EAA <sup>1</sup>	458,91	273,12	612,83	1496,88	326,84

Rezultatele indică faptul că în experimentul dintre nucleul semințelor (3.1) cu tipurile citoplasmice 2,3,4, și 5, de exemplu, aminoacizii cei mai mari sunt prolină 885,12 – 1179,54  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  și acidul aspartic 840,07 – 1006,52  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Valorile cele mai mari pe totalul de aminoacizi liberi au fost obținute pentru liniile consangvinizate 3.4, care rezultă din experimentul cu citoplasma tipul 4.

Alți aminoacizi importanți din semințele de porumb au fost acidul gamma-aminobutiric, acidul glutamic, lizina, alanina și histidina cu cantități de 65,59 – 871,96  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , 41,75 – 577,24  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , 23,89 – 507,42  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , 36,72 – 352,11  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  și 6,02 – 211,43  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Valorile nucleului semință pentru prolină, acid aspartic și lizină au fost mult mai mari în eșantionul 4.1 așa cum se arată în tabelul 1.2., 1522,20  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , 1642,84  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  și 845,47  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Cantități mici de glicină 31,34 – 125,03  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , serină 11,85 – 89,81  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , valină 6,30 – 76,21  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , ornitină 9,62 – 89,18  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , au fost determinate din linii consangvinizate de porumb.

Nivelurile de tirozină  $108,99 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , au fost mai mari decât izoleucina ( $\leq 45,67 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), metionina ( $\leq 32,99 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), treonina ( $\leq 42,40 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) și leucina ( $\leq 36,73 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ).

În rezultatele obținute valorile Asp și Glu constituie suma valorilor acidului aspartic și asparaginei, respectiv acidului glutamic și glutaminei, deoarece metoda de derivatizare schimbă glutamina și asparagina în acid glutamic și respectiv acid aspartic.

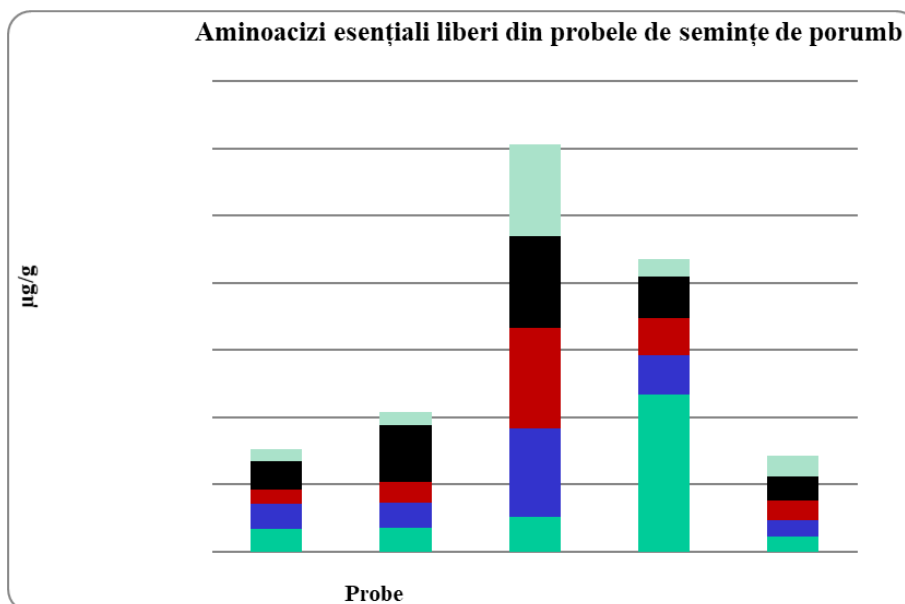


*Figura 1.4. Aminoacizii liberi din liniile de semințe consangvinizate de porumb*



Figura 1.5 prezintă o comparație a aminoacizilor esențiali totali determinată în probele de porumb (Ala, Thr, Val, Leu, Ile, Se, Met, Orn, Phe, Lys, His). În comparație cu semințele nucleu (1.1, 2.1, 3.1, 4.1, 5.1), cu un nivel ridicat de FAA esențiali (în semințe 4.1), liniile consangvinizate 3.2, 3.3, 2.4, 3.4 și 3.5 prezenta cea mai mare concentrație.

Rezultatele sunt utile pentru alegerea de linii consangvine, cu trăsături bune privind calitățile nutriționale și funcționale pentru dezvoltarea proceselor de selectare a germoplasmei de elită.



**Figura 1.5.** Aminoacizi esențiali liberi din probele de semințe de porumb. Notația probelor de jos în sus: 1: 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5; 2: 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5; 3: 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5; 4: 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5 și 5: 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5; prima proba (culoare verde) din fiecare grup reprezintă nucleul seminței de porumb iar celelalte 4 probe reprezintă liniile

### **Determinarea acizilor grași**

În urma analizei efectuate asupra celor 25 de probe de semințe de linii de porumb consangvinizate, acizii grași predominanți identificați au fost: C18:2, C18:1, C16:0, C18:0.

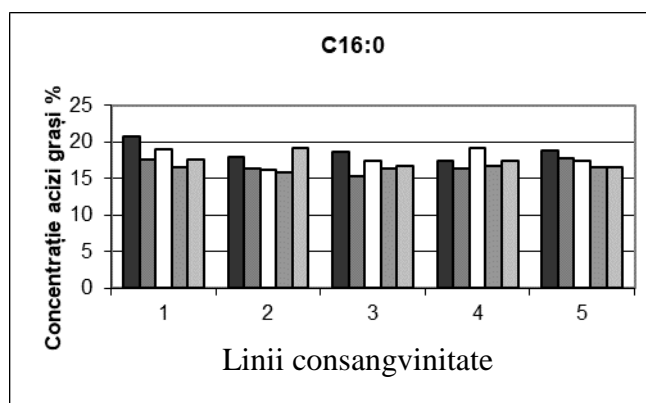
Metoda a fost validată prin injectarea unei soluții standard de acizi grași, care a suferit aceeași procedură de derivatizare. Ordinea de eluție a acizilor grași este prezentată în tabelul 1.3.

**Tabelul 1.3.** Acizi grași identificați în liniile consangvinizate de extracte de semințe de porumb

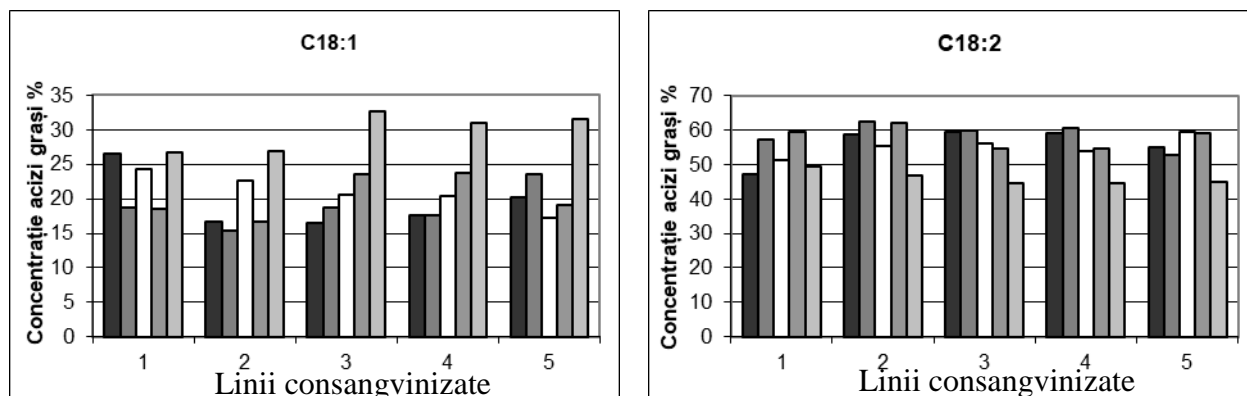
Nr. crt.	Compus	Rt(min)
1	C11:1 (undecenoic acid=SI)	16,09
2	C16:1 (palmitoleic acid)	23,13
3	C16:0 (palmitic acid)	23,4
4	C18:2 (linoleic acid)	25,55
5	C18:1 (oleic acid)	25,6
6	C18:0 (stearic acid)	25,79
7	C20:1 (11-eicosenoic acid)	27,75

Nr. crt.	Compus	Rt(min)
8	C20:0 (eicosanoic acid, arachidic acid)	27,99
9	C22:0 (benenic acid) M=354	30,04
10	C24:0 (lignoceric acid) M=382	31,87

Acizii grași saturați dominanți au fost: acidul palmitic, în proporție de 15,83–20,81%, respectiv acidul stearic, 3,2–3,7%. Cel mai întâlnit acid gras în probele de semințe de porumb a fost acidul linoleic, un acid gras poli-nesaturat Omega-6, cu o prezență de 45,06% – 62,34%, urmat de acidul oleic, un acid gras mono-nesaturat (MUFA), cu valori variind între 15,03% și 23,59%. Figura 1.6 prezintă acizii grași saturați, iar figura 1.7 ilustrează acizii grași nesaturați, identificați în liniile consangvinizate de porumb 1-5.



**Figura 1.6.** Acizii grași saturați din liniile consangvinizate de semințe de porumb 1-5



**Figura 1.7.** Acizii grași nesaturați din liniile consangvinizate de semințe de porumb 1-5

Barele negre din graficele de mai sus reprezintă rezultatele pentru nucleeele semințelor de porumb TC 209(1.1), TC 316(2.1), TC 243(3.1), TB 367(4.1), D 105(5.1), iar celelalte 4 bare reprezintă rezultatele pentru liniile consangvinizate de semințe de porumb 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, obținute în experimentele TC 209 (1.1), cu următoarele tipuri de citoplasmă: 2 (CIT T 248), 3 (CIT TB 329), 4 (CIT TC 177) și 5 (CIT TC 221), ș.a.m.d.; 1.1 este comparat cu 1.2, 1.3, 1.4 și 1.5; tipul 2.1 cu 2.2 – 2.5, 3.1 cu 3.2-3.5, 4.1 cu 4.2-4.5, respectiv 5.1 cu 5.2-5.5.

### ***Validarea metodei***

În cadrul acestui studiu, am efectuat validarea metodei utilizând etaloane de aminoacizi. Precizia obținută pentru R.S.D a prezentat valori mai mici decât 23% și acuratețea a fost mai mica de 20% pentru etaloanele de aminoacizi conținând 60 și respectiv 80 μg/ml. L.O.D. și L.O.Q. ale proceduri analitice au variat de la 10<sup>-3</sup> la 10<sup>-2</sup> μg μl<sup>-1</sup>.

### ***Concluzii***

Metoda de extracție și tehnica GC-MS s-au dovedit a fi adecvate pentru determinarea aminoacizilor liberi (FAA) în linii consangvinizate de porumb. Valorile cele mai mari ale aminoacizilor liberi determinate în semințele de porumb au fost pentru acidul aspartic și prolină, urmat de lizina, alanina, acidul glutamic, histidină și gama-aminobutiric. FAA a determinat și arătat diferențe importante între liniile consangvinizate de porumb studiate.

Acizii grași saturați dominanți au fost acidul palmitic, respectiv acidul stearic. Cel mai întâlnit acid gras în probele de semințe de porumb a fost acidul linoleic, un acid gras poli-nesaturat Omega-6, urmat de acidul oleic, un acid gras mono-nesaturat (MUFA). Concentrația de acid oleic este puternic corelată negativ cu cea a acidului linoleic, sugerând că selecția genotipului poate îmbunătăți calitățile funcționale și nutriționale ale acestor linii consangvinizate.

Prin alegerea liniilor cu trăsăturile cele mai bune, calitatea nutritivă și funcțională a semințelor de porumb poate fi îmbunătățită.

## ***2. Determinarea acizilor grași în plasmă și carne de păstrăv prin GC-MS***

***Obiectivul studiului*** a fost acela de a dezvolta o metoda simplă și de încredere pentru a compara acizii grași în plasmă și carne de păstrăv [6].

### ***Materiale și metode***

Acizii grași (FA) au fost determinați din probe de plasmă și carne de păstrăv. FA au fost extrași din 0,5 ml de plasmă prin adăugarea a 0,5 ml cloroform: metanol 2: 1 (v: v). Soluția a fost agitată puternic timp de 30 s, la temperatura camerei. 1 g de carne păstrăv a fost zdrobită cu 1 g de nisip de cuarț într-un vas ceramic și omogenizat cu 5 ml apă distilată. După o centrifugare de 5 minute, supernatantul a fost colectat și acizii grași au fost extrași utilizând același solvent și condițiile de extracție ca pentru plasma. Probele au fost centrifugate timp de 5 min (5800 rot / min) și metanolul superior - faza apoasă a fost îndepărtată. Faza de cloroform inferior care conține acizii grași extrași se usucă într-un curent de azot, la temperatura de 60 °C. Lipidele au fost convertite în FAME corespunzătoare (acizi grași metil ester) prin esterificarea funcțiilor carboxilice cu 200 μl metanol: acetil clorură de 4: 1 (v: v), 20 min, 80 °C. Derivații s-au evaporat la sec cu un curent de azot, la 60 °C, și apoi s-au dizolvat în 500 μl diclormetan. 10 μg de C11: 1 s-au adăugat la fiecare probă pentru determinare cantitativă prin GC-MS.

### ***Aparatură experimentală***

Acizii grași au fost separați și identificați cu ajutorul unui gaz cromatograf Trace GC echipat cu o coloană capilară RTX-5MS (30 m x 0,25 mm I.D., 0,25 μm grosime film) și cuplat

la un spectrometru de masă cvadripolar Trace DSQ (Thermo Finnigan). Programul de temperatură pentru separarea FAME a fost: 50 °C timp de 2 min, în creștere cu o viteză de 8 °C / min la 310 °C (8 minute). Heliul a fost folosit ca gaz purtător la un debit de 1 ml/min. 1 μl din fiecare probă a fost injectat în GC-MS, folosind modul de divizare (10:1) utilizând autosamplerul TriPlus. Sursa de ioni cu impact de electroni (EI) a lucrat la 70 eV. Au fost asigurate următoarele condiții: temperatura liniei de transfer a fost stabilită la 250 °C, temperatura injectorului, la 200 °C și temperatura sursei de ioni, la 250 °C. Curentul de emisie a fost 100 μA. Analiza calitativă a fost efectuată în domeniul de mase 50-500 a.m.u.

### Rezultate și discuții

Profilul acizilor grași din pește de apă dulce este unic în varietatea și gradul de nesaturare [8-14]. Rolul lor nutritiv este recunoscut, cei doi acizi grași omega-3 principali, acidul eicosapentaenoic și acidul docosahexaenoic, având multiple efecte benefice asupra organismului atât la copiii, în faza de creștere, cât și la adulți. Astfel, administrarea acestor acizi grași Omega-3 poate contribui la reducerea nivelului colesterolului, reglarea tensiunii arteriale, normalizarea ritmului cardiac, scăderea riscul apariției cancerului la sân [15],[16]. Este foarte mult studiată variația în funcție de anotimp a acestor nutrienți [17-19]. Prin urmare, este esențial să existe o metodă simplă și rapidă pentru caracterizarea calitativă și cantitativă a acizilor grași mai puțin frecvenți (lanțurile lungi de acizi grași polinesaturați). Sensibilitatea și selectivitatea metodei fac GC-MS o metodă deosebit de utilă pentru analiza FAME [7],[20]. Figura 2.1 prezintă cromatograma de curent ionic total a unui amestec de acizi grași din plasmă de păstrăv. FAME au fost identificați folosind biblioteca de spectre NIST.

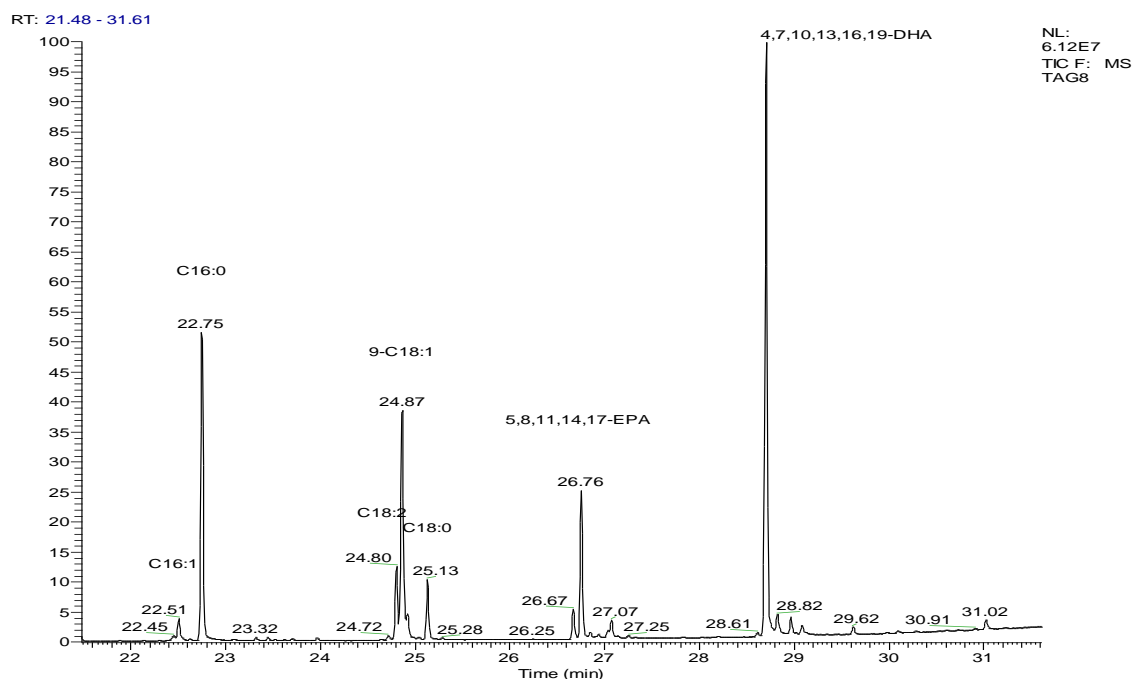


Figura 2.1. Cromatograma TIC de separare a acizilor grași din plasmă de păstrăv prin GC-MS

Tabelul 2.1. prezintă compoziția acizilor grași (în % de masă din totalul de acizi grași) în plasmă și carne de păstrăv. Acizi grași saturați reprezintă doar 25,61% (în plasmă) și 31,04% (în carne) din totalul de acizi grași, acidul palmitic (C16: 0) având cea mai mare concentrație. Acidul stearic (C18: 0) este prezent proporții relativ mai mici (5,42% și 6,27%). Acizii grași

nesaturați (UFA) reprezintă mai mult de jumătate din totalul acizilor grași ce se găsesc în probele de plasmă și cele de carne (74,39% și 68,95%, respectiv). Majoritatea acizilor mononesaturați (MUFA) au fost: C16: 1, C18: 1n-7, C18: 1 n-9, acid oleic (C18: 1n-9) fiind cel mai abundent. Acidul linoleic (C18: 2 ω-6) reprezintă 19% (în plasmă) și 11,3% (în carne), din totalul UFA. PUFA ω-3 (suma EPA și DHA) reprezintă cca. 26% și respectiv 36,6%, din totalul de acizi grași găsiți în plasmă de păstrăv și carne.

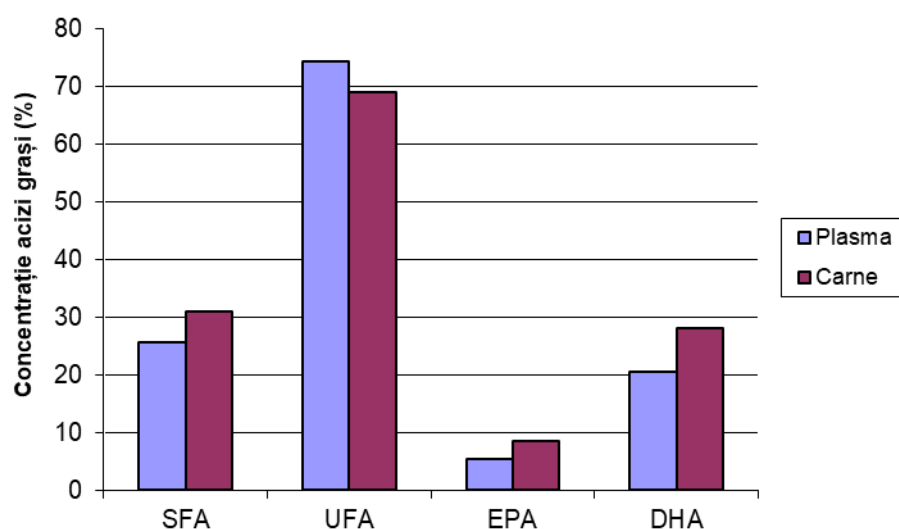
**Tabelul 2.1.** Concentrațiile acizilor grași (%) din plasma și carne de păstrăv, n = 5

	R <sub>t</sub> (min)	Acizi grași (%)	
		Plasma	Carne
hexadecenoic acid (C16:1)	22,51	2,86	2,19
hexadecanoic acid (C16:0)	22,75	20,18	24,78
9,12 octadecadienoic acid (C18:2)	24,80	14,13	7,81
9-octadecenoic acid (C18:1)	24,87	27,79	18,91
octadecenoic acid (C18:1)	24,93	3,62	3,43
octadecanoic acid (C18:0)	25,13	5,42	6,27
5,8,11,14,17 eicosapentaenoic acid (C20:5)(EPA)	26,76	5,41	8,51
4,7,10,13,16,19 docosahexaenoic acid(C22:6)(DHA)	28,71	20,59	28,11
<b>SFA</b>		25,61	31,04
<b>UFA</b>		74,39	68,95
<b>EPA</b>		5,41	8,51
<b>DHA</b>		20,59	28,11

(Rt - timpul de retenție; SFA - acizi grași saturați, UFA - acizi grași nesaturați;

SFA = C16: 0 + C18: 0; UFA = C16: 1 + C18: 2 + 9-C18: 1 + C18: 1 + EPA + DHA)

Figura 2.2. arată proporția considerabilă a acizilor grași nesaturați (UFA) în comparație cu cei nesaturați (SFA), în plasmă cât și în carne. Trebuie remarcat faptul că ω-3 PUFA reprezintă 53% din totalul UFA.



**Figura 2.2.** Conținutul de acizi grași din probele de plasmă și carne de păstrăv.

În plasmă, raportul  $\omega$ -3 /  $\omega$ -6 a fost de 1,84, în timp ce în carne, 4,68. Raportul DHA (22:6  $\omega$ -3) / EPA (20:5  $\omega$ -3) a fost de 3,8 în plasmă și 3,3 din carne. Acest rezultat poate fi explicat prin faptul că EPA nu se găsește în cantități mari în țesuturi, fiind utilizat rapid în biosinteza DHA și eicosanoidelor.

### ***Concluzii***

Metoda GC-MS dezvoltată aici pentru determinarea acizilor grași din probele de plasmă și carne de păstrăv este simplă și potrivită pentru scopul urmărit [6],[21]. Parametrii de validare obținuți au fost buni.

Concentrația de PUFA din plasma și de carne de păstrăv a fost mai mare decât cea a celorlalți acizi grași, în următoarea ordine: PUFA > MUFA > SFA. Rezultatele noastre dovedesc că păstrăvul este o sursă valoroasă de acizi grași esențiali.

## ***3. Compararea compoziției de nutrienți din unele uleiuri vegetale***

### ***Obiectivul studiului***

Scopul studiului a fost de a evalua și compara conținutul de acizi grași și ioni ai metalelor prezente în diferite uleiuri vegetale. Valorile acizilor grași obținute au fost comparate cu cele din carnea de păstrăv. În acest sens, a fost elaborată și validată o metodă de extracție, separare cromatografică cu identificarea spectrelor specifice unor uleiuri vegetale, provenind din diverse tipuri de semințe. Analiza cantitativă a acizilor grași derivatizați sub formă de esteri metilici (FAME – Fatty Acids Methyl Esters) s-a realizat prin tehnica GC / MS.

Studiul propune de asemenea o metodă simplă de determinare a conținutului de ioni ai metalelor (Na, Mg, K, Mn, Cd, Cu și Cr), utilizând spectrometru de masă cu plasmă cuplată inductiv ICP-MS.

### ***Materiale și metode***

Analiza acizilor grași totali în unele uleiuri vegetale a fost realizată prin tehnica spectrometriei de masă cuplate cu cromatografia de gaze (GC / MS). Acizii grași au fost derivatizați sub formă de ester metilic, separați prin GC și identificați prin tehnici MS. Unele uleiuri vegetale utilizate ca suplimente alimentare, achiziționate de pe piața ecologică din România și care provin din diferite țări europene, inclusiv România, au fost comparate în ceea ce privește compoziția în acizi grași și ioni metalici. Probele de ulei studiate au fost din semințe de in, mac, struguri, cânepă, nuci, soia, dovleac, susan și măslina.

Pentru a evalua conținutul lor în acizi grași a fost utilizat un spectrometru de masă cuadrupolar Trace DSQ Thermo Finnigan cuplat cu un gaz cromatograf Trace GC. Probele de ulei, derivatizate ca esteri metilici ai acizilor grași (FAME), au fost separate pe o coloană capilară RTX-5MS, 30 m x 0,25 mm, grosimea peliculei 0,25  $\mu$ m. Programul de temperatură

utilizat a fost: 50 °C, 2 min, 8 °C / min la 310 °C (10 min); gazul purtător a fost heliu 6.0 la un debit de 1 ml / min. Au fost urmate următoarele condiții: linia de transfer, temperatura de 250 °C, temperatura injectorului 250 °C; temperatura sursei de ioni 250 °C; Splitter: 10: 1; energia electronilor a fost 70 eV și curentul de emisie, 100μA.

Derivatizarea și separarea au constat în următoarele etape [22]: probele de ulei vegetal (20 μl) au fost transformate în esteri ai acizilor grași metilici (FAME) pentru analiza GC, prin esterificare cu 200 μl metanol: clorură de acetil (4: 1 v / v) timp de 20 min la 80 °C. Derivații au fost evaporati la sec într-un curent de azot la 60 °C și apoi dizolvați în 500 μl diclormetan. 1 μl a fost injectat în GC automat, cu autosampler-ul. Identificarea acizilor grași a fost obținută prin compararea acizilor grași de metil esteri din spectrele de masă înregistrate în intervalul m/z 35-500, folosind spectrele de masă ale etaloanelor FAME ale bibliotecii NIST.

Analiza elementară a conținutului de metale a fost realizată prin spectrometrie de masă cu plasmă cuplată inductiv (ICP-MS). Au fost aplicate următoarele condiții de funcționare: debitele de gaz de nebulizare de 0,86 L min<sup>-1</sup>; debitul de gaz auxiliar de 1,2 L min<sup>-1</sup>; flux de gaz și plasma de 15 L min<sup>-1</sup>; Tensiunea lentilă de 7,25 V; putere 1100 W ICP RF; CeO / Ce = 0.027; raport Ba<sup>++</sup> / Ba<sup>+</sup> = 0,025.

În uleiurile vegetale investigate s-au găsit cantități mari de acizi grași nesaturați (UFA), variind de la 71,49% (ulei de măsline), până la 89,51% (ulei din semințele de in). Secvența acizilor grași determinați în uleiuri a fost după cum urmează: măsline (71,49%) < susan (76,94%) < dovleac (78,16%) < soia (82,92%) < nuci (83,7%) < cânepă (86,19%) < struguri (87,61%) < mac (88,93%) < semințe de in (89,51%). Valorile sunt semnificativ mai mari decât în cazul acizilor grași nesaturați determinați din carnea de păstrăv, unde cea mai scăzută valoare determinată este de 68,96%. (tabelul 3.1 și 3.2).

**Tabelul 3.1.** Esterii metilici ai acizilor grași identificați în uleiurile vegetale

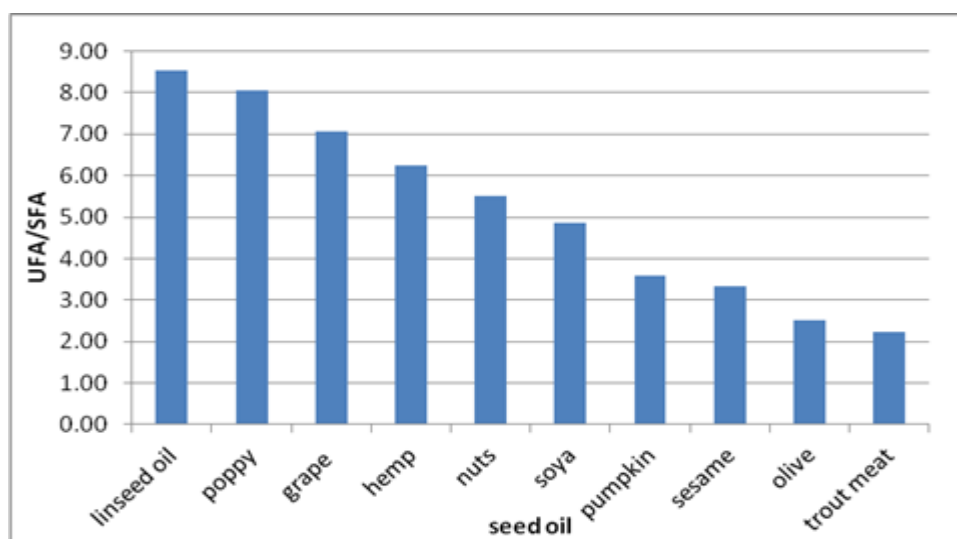
FAME	In	Mac	Strugure	Cânepă	Nucă
C16:1	0,06	0,39	0,15		0,27
C16:0	7,15	9,06	9,08	10,05	12,09
C18:2	18,34	71,93	63,10	58,35	59,32
C18:1	68,34	14,83	24,40	11,78	10,83
C18:3	-	-	-	16,06	9,46
C18:0	3,35	2,00	3,32	3,75	3,11
EPA	1,77	1,78	-	-	3,85
C20:1	1	-	-	-	-
C20:0	-	-	-	-	-
DHA	-	-	-	-	-
C22:0	-	-	-	-	-

**Tabelul 3.2.** Esterii metilici ai acizilor grași identificați în uleiurile vegetale, respectiv păstrăv

FAME	Soia	Dovleac	Susan	Măsline	Păstrăv
C16:1	-	0,52	0,61	2,09	2,19
C16:0	12,40	17,18	15,62	22,70	24,80
C18:2	54,31	57,42	42,23	3,32	7,81

FAME	Soia	Dovleac	Susan	Măsline	Păstrăv
C18:1	27,98	20,22	32,54	65,20	22,30
C18:3	-	-	-	-	-
C18:0	3,89	4,65	5,48	4,43	6,27
EPA	-	-	0,65	-	8,51
C20:1	-	-	0,91	0,87	-
C20:0	0,38	-	0,89	1,35	-
DHA	0,63	-	-	-	28,10
C22:0	0,42	-	1,08	-	

Raporturile UFA /SFA au variat de la 2,51 (semințe de măsline), până la 8,52 (semințe de in), și au înregistrat variații similare ca UFA. În cazul cărnii de păstrăv raportul a fost de 2,22 (Fig. 3.1.).



**Figura 3.1.** Comparația raportului UFA / SFA în probele studiate

Concentrațiile acizilor grași polinesaturați (PUFA), determinate în uleiurile vegetale studiate, au variat în următoarea ordine: măsline (3,32%) < semințe de in (20,11%) < susan (42,88%) < soia (54,94%) < dovleac (57,42%) < struguri (63,11%) < nuci (72,6%) < mac (73,71%) < cânepă (74,41%).

Valoarea PUFA din carne de păstrăv a fost de 44,43%. Cu excepția uleiului de in, aceste niveluri sunt comparabile cu cele ale uleiurilor vegetale PUFA bogate, cum ar fi semințe de uleiuri de struguri (65,40%), floarea soarelui (66,00%), semințe de ardei iute (67,80%), Perilla (69,90%), semințe de in (71,80%), semințele de coacăze negre (75,30%), șofrănel (77,30%) și semințele de cânepă (79,10%).

Acidul lenoleic (C18:2) a avut cea mai mare valoare în toate uleiurile vegetale studiate, cu excepția uleiurilor din semințe de in și de măsline iar acidul oleic (C18:1) a fost cel mai important.

Acid linolenic (C18:3) a fost prezent numai în cânepă (16,06%) și nuci (9,46%).



Acizii grași DHA sunt cei mai mari în carne de păstrăv și nu se găsesc în uleiurile vegetale, dar EPA, de 8,51% în carne de pește, a arătat o valoare scăzută în uleiuri vegetale, de 3,85% în nuci, 1,78% în mac și semințe de in și 0,65% în ulei de susan.

Raporturile de PUFA / SFA, au variat de la 0,12 (de măslin) până la 6,66 (semințe de mac), și au fost găsite în următoarea ordine: măslin < susan < semințe de in < dovleac < soia < nuci < struguri < cânepă < mac.

### ***Validarea metodei***

Metoda a fost validată utilizând acizi grași etalon. S-au obținut parametri de validare buni. Coeficienții de corelație pentru compușii individuali calculați pentru liniaritate au fost cuprinși între 0,982-0,983. Precizia a dat pentru deviația standard relativă (R.S.D.) valori mai mici de 10% pentru acizii grași importanți între 2,2-8,9%. Rezultatele analitice raportate pentru concentrațiile acizilor grași analizați reprezintă media a două măsurători distincte.

### ***Concluzii***

Metoda GC-MS dezvoltată pentru determinarea acizilor grași din diferite uleiuri vegetale extrase din semințe s-a dovedit a fi bine aleasă. Parametrii de validare ai metodei de analiză cantitativă au fost buni. Concentrația acizilor grași polinesaturați (PUFA) determinată în uleiurile vegetale a fost mai mare decât cea de acizi grași saturați (SFA), în ordinea : PUFA > MUFA > SFA. Rezultatele noastre au demonstrat că uleiurile vegetale extrase din semințele analizate reprezintă o sursă valoroasă de acizi grași esențiali.

Determinarea comparativă a FAME în uleiurile vegetale studiate, realizată prin metoda GC-MS, a arătat rezultate interesante: valorile UFA determinate din uleiurile vegetale au depășit valorile UFA din carnea de păstrăv, în plus, valorile PUFA determinate din majoritatea uleiurilor vegetale au fost mai mari comparativ cu cea determinată din carnea de păstrăv (cu excepția uleiului de măslin, de in și susan).

Metoda utilizată s-a dovedit corespunzătoare pentru analizele cantităților reduse de probe alimentare, rezultatele obținute putând fi utilizate în diferite scopuri: controlul calității alimentelor, controlul procesării alimentelor, clasificare nutritivă, controlul dietei și studii metabolice.

## ***4. Analiza comparativă a conținutului de acizi grași și metale din extracte de semințe***

### ***Obiectivul studiului***

Scopul acestui studiu a constat în identificarea și analiza conținutului de acizi grași, precum și determinarea mineralelor și a metalelor din probe de semințe provenind de la o varietate de plante. Astfel, pentru determinarea calitativă și cantitativă a acizilor grași au fost luate în considerare semințe selecționate provenind de la o serie de specii de plante achiziționate de pe piața românească. S-a utilizat cromatografia de gaze cuplată cu spectrometria de masă (GC-MS), o tehnică modernă ce s-a dovedit deosebit de utilă pentru realizarea scopului stabilit.

Deoarece determinarea substanțelor minerale din alimentație prezintă un interes important, unele metale, cum ar fi fierul, magneziul, zincul și cuprul fiind considerate micronutrienți esențiali, în cadrul studiului am dezvoltat o metodă de analiză calitativă și

cantitativă a acestora, pornind de la tehnica spectrometriei de masă cu plasmă cuplată inductiv (ICP-MS). Unele minerale (Ca, Na, Mg, K, Zn) au fost determinate din probele de semințe prin spectrometrie de absorbție atomică cu flacără, utilizând un instrument Analytik Jena, ContrAA 700, în flacără de amestec acetilenă-aer.

### ***Materiale și metode –etapa experimentală***

Probele studiate au fost semințe de in, mac, struguri, cânepă, nucă, dovleac, susan, pepene verde și chia.

Analiza acizilor grași din componența semințelor analizate a fost realizată prin tehnica spectrometriei de masă cuplate cu cromatografia de gaze (GC / MS). Acizii grași au fost derivatizați sub formă de ester metilic, separați prin GC și identificați prin tehnici MS [23],[24].

200 mg din fiecare tip de probă, constând în semințe ale plantelor menționate mai sus au fost zdrobite și apoi extrase folosind 0,6 ml NaCl și 0,8 ml metanol, trecute printr-o baie de ultrasunete pentru 1 minut, apoi amestecate cu 0,8 ml cloroform timp de 2 minute, soluția obținută fiind centrifugată 3 minute la 5800 rpm. Stratul inferior a fost colectat și extracția a fost repetată cu 0,4 ml de cloroform. Extractul obținut a fost uscat, acizii grași fiind convertiți în esteri metilici (FAME) prin esterificarea funcțiilor carboxilice, adăugându-se în final 10 μl de C11:1 (acid undecaenoic) ca standard intern.

Pentru a evalua conținutul probelor de semințe în acizi grași a fost utilizat un spectrometru de masă cuadrupolar Trace DSQ ThermoFinnigan, cuplat cu un gaz cromatograf Trace GC. Separarea esterilor metilici ai acizilor grași s-a realizat utilizând o coloană capilară RTX-5MS (30 m x 0,25 mm, grosimea peliculei 0,25 μm). Fiecare probă a fost extrasă în dublu exemplar.

În vederea determinării conținutului de substanțe minerale (metale și oligoelemente), s-a utilizat tehnica spectrometriei de masă cu plasmă cuplată inductiv (ICP-MS). Eșantioanele de semințe au fost uscate, omogenizate și apoi trecute printr-o sită 20 mesh, în scopul obținerii unor particule extrem de fine. Metoda de digestie cu microunde a fost optimizată, utilizându-se un sistem Mars 5 Microwave. Digestia probelor a fost efectuată după un program prezentat în tabelul 4.1. Aceste soluții au fost apoi analizate prin tehnica ICP-MS după diluția corespunzătoare, folosind o calibrare standard externă.

În vederea trasării curbei de calibrare pentru analiza cantitativă s-a utilizat o soluție ICP Multi Element Standard Solution XXI CertiPUR de înaltă puritate, produsă de Merck Germania.

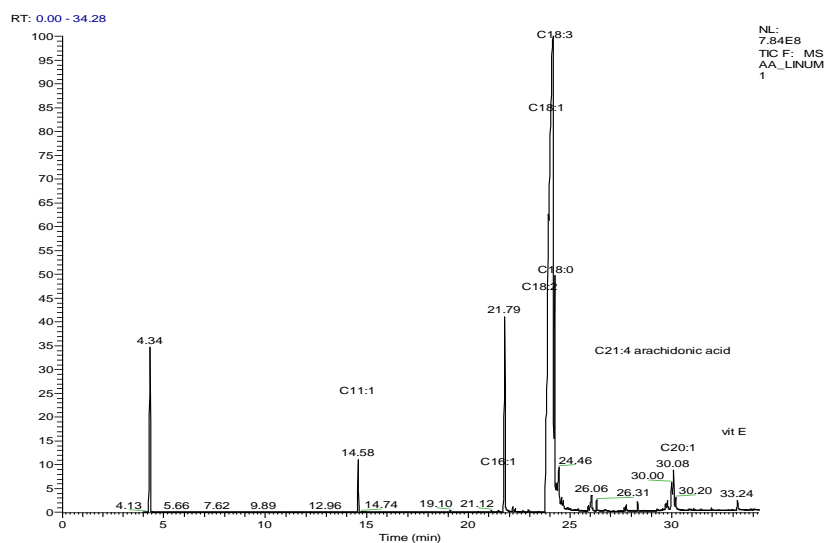
Unele minerale (Ca, Na, Mg, K, Zn) au fost determinate din probele de semințe prin spectrometrie de absorbție atomică cu flacără, utilizând un instrument Analytik Jena, ContrAA 700, în flacără de amestec acetilenă-aer. Soluțiile standard cu concentrație de 1000 mg·l<sup>-1</sup>, pentru fiecare mineral în parte (Ca, Na, Mg, K, Zn) au fost obținute prin diluție cu soluție de acid azotic 1% (v/v).

**Tabelul 4.1.** Programul utilizat pentru digestia probelor, în vederea extracției.

Etapă	Putere		Rampă de timp (min)	Presiune (psi)	Temperatură (°C)	Timp programat (min)
	Nivel	%				
1.	800	100	15	800	200	20
2.	15 min-răcire					

### Rezultate și discuții

Cromatograma de separare a esterilor metilici ai acizilor grași identificați în semințele de in este prezentată în figura 4.1. FAME au fost identificați folosind biblioteca de spectre NIST.



**Figura 4.1.** Cromatograma de separare în semințe de in FAME

Metoda aplicată a permis identificarea și evaluarea concentrațiilor unui număr important de acizi grași, prezenți în extractele de semințe analizate, astfel: acizi grași nesaturați (acid palmitoleic C16:1, acid oleic C18:1, acid linoleic C18:2, acid  $\alpha$ -linolenic C18:3), respectiv acizi grași saturați (acid palmitic C16:0, acid stearic C18:0, acid arachidic – eicosanoic C20:0, acid behenic C22:0, acid lignoceric C24:0). Analiza compoziției acestora a evidențiat prezența în medie de 14 % a acizilor grași mononesaturați (MUFA), 16% a acizilor grași saturați (SFA), precum și o medie de 70% pentru acizii grași polinesaturați (PUFA).

Din categoria acizilor grași polinesaturați (PUFA), se remarcă prin concentrația semnificativ ridicată acidul linoleic (C18:2 – LA), omega-6 și acidul  $\alpha$ -linolenic (C18:3 – ALA), omega-3, considerați acizi grași esențiali.

Concentrația conținutului total de acizi grași saturați a variat între valoarea de 11,13% (la semințele de strugure și dovleac) și 28,22% (semințele de pepene verde).

Raportul acizi grași nesaturați/acizi grași saturați (UFA/SFA), pentru semințele analizate, a prezentat următoarele valori: 7,99% la semințele de strugure și dovleac, 6,92% la nucă, 5,81% la chia, 5,57% la semințele de mac, 5,21% la cânepă, urmate de in (4,54%), susan (4,02%) și pepene verde (2,64%).

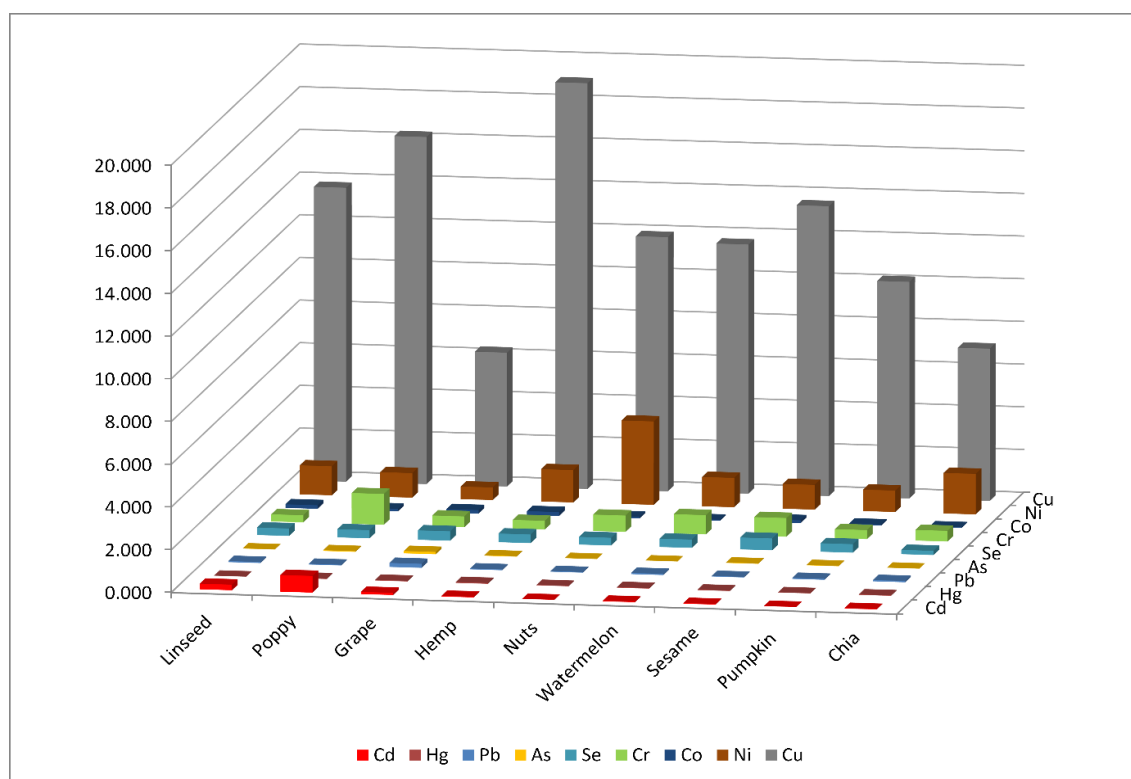
Acidul alfa-linolenic (ALA), componenta principală a acidului Omega 3, joacă un rol important în prevenirea bolilor cardiovasculare. ALA contribuie la protejarea vaselor sanguine împotriva distrugerilor provocate de procesele inflamatorii. În cazul consumului semințelor de in, de exemplu, s-a constatat creșterea concentrației altor doi acizi grași în fluxul sanguin: acidul eicosapentaenoic (ETA) și acidul docosapentaenoic (DPA), acizi a căror prezență contribuie de asemenea la protecția anti-inflamatorie [12], [25-26].

Conținutul în Omega-6 (C18:2 acid linoleic – LA) prezintă următoarele concentrații, în ordine descrescătoare a valorii acestora: mac, strugure, nucă, cânepă, dovleac, pepene verde, susan, in și chia.

În ceea ce privește conținutul în Omega-3 (C18:3 acid alfa-linolenic - ALA), valorile determinate din semințele analizate, în ordine descrescătoare, sunt următoarele: chia, in, strugure, cânepă, nucă, dovleac, pepene verde, mac, lipsind complet în cazul susanului.

Valorile determinate pentru acizii grași, în mg/g, variază de la 169,7 în cazul semințelor de chia, la 133,4, în cazul macului, 98,6 (susan), 53,95 (nucă), 43,98 (dovleac), 27,41 (cânepă), 19,0 (strugure), respectiv 9,02, în cazul pepenelui verde.

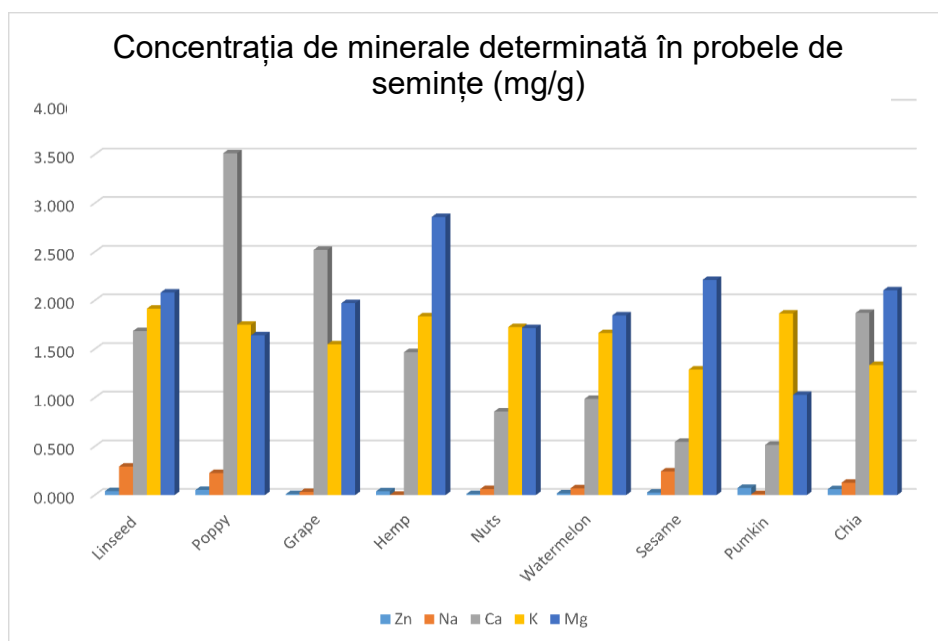
Prin metoda elaborată pornind de la tehnica spectrometriei de masă cu plasmă cuplată inductiv (ICP-MS), am urmărit determinarea conținutului de oligoelemente (substanțe cu structură simplă, cu rol în procesele biologice ale organismelor) pentru cobalt (Co), crom (Cr), nichel (Ni), arsenic (As), mercur (Hg), plumb (Pb), cadmiu (Cd), seleniu (Se) și cupru (Cu), în extractele obținute din probele de semințe analizate (fig. 4.2).



**Figura 4.2.** Concentrații ale metalelor determinate în probele de semințe analizate, (µg/g).

Metalele grele identificate cu cea mai mare concentrație, în probele de semințe analizate, sunt: Cu, Ni, Cr și Se. Plumbul nu a depășit valorile maxime recomandate, în timp ce cadmiul a depășit aceste valori doar în semințele de mac.

Toate mineralele identificate în probele din semințe au fost prezente în cantități ridicate (fig. 4.3), cea mai mare valoare a concentrației fiind cea de Ca, determinată în semințele de strugure și mac, în timp ce în susan și chia este prezent în concentrații reduse. Magneziul a prezentat valori ridicate pentru toate semințele analizate, cea mai mare concentrație înregistrându-se în semințele de cânepă [24].



**Figura 4.3.** Valorile concentrațiilor principalelor minerale identificate în probele de semințe analizate

### **Validarea rezultatelor**

Pentru validarea metodei de analiză au fost utilizate standarde de acizi grași. Metoda GC-MS aplicată a prezentat parametri de validare superiori. Precizia metodei este caracterizată prin valori ale abaterii standard relative (R.S.D.) mai mici de 10% pentru acizii grași importanți determinați. Valoarea pentru parametrul de recuperare a fost 83,3%.

Acuratețea (exprimată ca bias – eroare de măsurare) și precizia (exprimată ca deviație standard relativă) pentru tehnicile ICP-MS utilizate au fost determinate prin analiza materialelor de referință certificate CRM-NCS ZC85006 Tomato (China National Analysis Center for Iron and Steel, Beijing, China). Precizia a fost obținută prin compararea concentrației măsurate cu valorile materialului certificat și a fost exprimată ca procentaj al randamentului de recuperare R. Rezultatele obținute au indicat plasarea concentrațiilor de elemente determinate prin metoda ICP-MS în intervalul de încredere de 95%, deviația standard relativă fiind mai mică de 10% pentru toate metalele determinate.

### **Concluzii**

Metoda de analiză utilizând cuplajul cromatograf de gaze – spectrometru de masă s-a dovedit a fi o metodă simplă, rapidă și eficientă. Valorile concentrațiilor acizilor grași poli-

nesaturați (PUFA) determinați în semințele analizate au fost mai mari decât ale acizilor grași saturați, confirmând valoarea lor nutritivă benefică pentru sănătate.

Semințele analizate au prezentat valori ridicate pentru mineralele identificate, calciul (Ca) regăsindu-se în cea mai mare concentrație în semințele de mac și de strugure.

Concentrațiile metalelor grele au respectat valorile recomandate, cu excepția cadmiului (Cd), în cazul semințelor de mac, demonstrând importanța monitorizării și controlului acestora în alimentație. Semințele de chia și de in, prin concentrațiile ridicate de acid linolenic Omega-3, au demonstrat o importantă valoare nutritivă.

## CONCLUZII GENERALE

În urma rezultatelor experimentale obținute în cadrul studiilor efectuate pe parcursul stagiului de doctorat, putem formula următoarele concluzii:

- ✓ În prezent, se remarcă un interes tot mai ridicat în ceea ce privește calitățile nutritive ale produselor alimentare, datorită influenței acestora asupra sănătății umane. Una dintre cauzele principale de apariție a bolilor cardiovasculare și a cancerului este constituită de conținutul dietei noastre, de alegerile alimentare incorecte. Din acest considerent, cercetările științifice cu privire la optimizarea conținutului de micronutrienți în produsele alimentare, precum și cererea tot mai mare de alimente sănătoase, impun necesitatea identificării de metode analitice simple și eficiente.
- ✓ GC-MS reprezintă o tehnică utilizată pe scară largă pentru identificarea și analiza acizilor grași, în urma derivatizării acestora în esteri metilici ai acizilor grași (FAME), cu aplicații multiple în analiza calităților nutriționale ale uleiurilor vegetale, ale diverselor extracte din plante și semințe, etc.
- ✓ În cadrul cercetărilor, am dezvoltat o metodă de analiză calitativă și cantitativă a conținutului de aminoacizi și acizi grași din 25 de probe de semințe de porumb. În acest sens, am analizat mai multe linii consangvinizate de semințe de porumb, în vederea sporirii productivității producției și dezvoltării unor specii de hibridi rezistenți la diferite condiții de mediu, cu valoare nutritivă ridicată și randament crescut. Separarea și identificarea aminoacizilor și a acizilor grași s-a realizat prin metoda GC-MS cu diluție izotopică. În vederea validării metodei, s-au utilizat etaloane de aminoacizi. Precizia a fost bună, R.S.D. dând valori mai mici decât 23% și acuratețea a fost mai mică de 20% pentru etaloanele de aminoacizi conținând 60 și respectiv 80 μg/ml.
- ✓ Metoda de extracție și tehnica GC-MS s-au dovedit a fi adecvate pentru determinarea aminoacizilor liberi (FAA) în linii consangvinizate de porumb. Valorile cele mai mari ale aminoacizilor liberi determinate în semințele de porumb au fost pentru acidul aspartic și prolină, urmat de lizina, alanina, acidul glutamic, histidină și gama-aminobutiric. FAA a determinat și arătat diferențe importante între liniile consangvinizate de porumb studiate. Prin alegerea liniilor cu trăsăturile cele mai bune, calitatea nutritivă și funcțională a semințelor de porumb poate fi îmbunătățită.
- ✓ Am elaborat o metodă de determinare calitativă și cantitativă a conținutului de acizi grași din plasmă și carne de păstrăv. A fost optimizată metoda de extracție, separare cromatografică și identificare de spectre a acizilor grași din plasma de păstrăv. Acizii grași au fost separați și identificați prin GC-MS. Metoda a fost validată utilizând acizii grași etalon de 20 μg / ml și 60 μg / ml. Limita de detecție (LOD) a fost 1ng și precizia și acuratețea au dat valori mai mici de 20%. Acizi grași saturați identificați au reprezentat doar 25,61% (în plasmă) și 31,04% (în carne) din totalul de acizi grași, acidul palmitic

(C16:0) având cea mai mare concentrație. Acizii grași nesaturați (UFA) au reprezentat mai mult de jumătate din totalul acizilor grași ce se găsesc în probele de plasmă și cele de carne (74,39% și respectiv 68,95%). Concentrația de PUFA din plasma și de carne de păstrăv a fost mai mare decât cea a celorlalți acizi grași, în următoarea ordine: PUFA > MUFA > SFA. Valorile ridicate ale MUFA în plasma de pește demonstrează înaltele calități nutritive ale acestui tip de carne.

- ✓ Au fost elaborate metode de extracție, separare cromatografică identificare și analiză cantitativă a acizilor grași din uleiuri vegetale (obținute din in, mac, struguri, cânepă, nuci, soia, dovleac, susan și măslina) și analiza comparativă a valorilor acizilor grași metilați determinați din plasmă de pește (FAME) și a altor nutrienți. Uleiurile vegetale utilizate ca suplimente alimentare, achiziționate de pe piața ecologică din România au fost comparate în ceea ce privește compoziția în acizi grași și ioni metalici. Analiza elementară a conținutului de metale a fost realizată prin spectrometrie de masă cuplată inductiv cu plasmă, (ICP -MS). Metoda a fost validată prin utilizarea de probe etalon de acizi grași. Concentrația acizilor grași polinesaturați (PUFA) determinată în uleiurile vegetale a fost mai mare decât cea de acizi grași saturați (SFA), în ordinea: PUFA > MUFA > SFA. Rezultatele noastre au demonstrat că uleiurile sunt o sursă valoroasă de acizi grași esențiali. Determinarea comparativă a FAME în uleiurile vegetale studiate a arătat rezultate interesante: valorile UFA determinate din uleiurile vegetale au depășit valorile UFA din carnea de păstrăv, în plus, valorile PUFA determinate din majoritatea uleiurilor vegetale au fost mai mari comparativ cu cea determinată din carnea de păstrăv (cu excepția uleiului de măslina, de in și susan).
- ✓ S-a dezvoltat o metodă de determinare a conținutului de acizi grași, respectiv de minerale și oligoelemente, prezente în probe de semințe aparținând diferitelor specii (semințe de in, mac, struguri, cânepă, nucă, dovleac, susan, pepene verde și chia). Analiza acizilor grași din componența semințelor analizate a fost realizată prin tehnica spectrometriei de masă cuplate cu cromatografia de gaze (GC / MS). Acizii grași au fost derivați sub formă de ester metilic, separați prin GC și identificați prin tehnici MS. În vederea determinării conținutului de metale, minerale și oligoelemente, s-a utilizat tehnica spectrometriei de masă cu plasmă cuplată inductiv (ICP-MS). Unele minerale (Ca, Na, Mg, K, Zn) au fost determinate din probele de semințe prin spectrometrie de absorbție atomică cu flacără, utilizând un instrument Analytik Jena, ContrAA 700, în flacără de amestec acetilenă-aer. Metoda GC-MS s-a dovedit a fi o metodă simplă, rapidă și eficientă. Valorile concentrațiilor acizilor grași poli-nesaturați (PUFA) determinați în semințele analizate au fost mai mari decât ale acizilor grași saturați, confirmând valoarea lor nutritivă benefică pentru sănătate. Semințele analizate au prezentat valori ridicate pentru mineralele identificate, calciul (Ca) regăsindu-se în cea mai mare concentrație în semințele de mac și de strugure. Concentrațiile metalelor grele au respectat valorile recomandate, cu excepția cadmiului (Cd), în cazul semințelor de mac, demonstrând importanța monitorizării și controlului acestora în alimentație. Semințele de chia și de in, prin concentrațiile ridicate de acid linolenic Omega-3, au demonstrat o mare importanță nutritivă.
- ✓ 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.



Rezultatele cercetărilor au fost diseminate în cadrul a 9 lucrări științifice, publicate în reviste de specialitate indexate ISI și/sau BDI, respectiv susținute la sesiuni și manifestări științifice cu caracter național sau internațional, atât în țară, cât și în străinătate (22 participări).

## BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Horj E., Iordache A., Culea M., *Isotopic dilution GC/MS method for methionine determination in biological media*, AIP Conference Proceedings, American Institute of Physics, 2011, pp. 241-246
2. Culea M., Scrob S., **Șuvar S.**, Podea P., Haș I., Muste S., *Determination of Amino Acids in Corn Seed by Gas Chromatography–Mass Spectrometry*, Analytical Letter, 2015, vol. 48(1), pp. 37-46
3. Culea M., Elena H., Iordache A., Cozar O., *Determination of Glycine in Biological Fluids by Isotopic Dilution Mass Spectrometry*, Asian J Chem, 2011, Vol. 23(10), pp. 4279-4281,
4. Iordache A-M., Horj E., Toma A., Cozar O., Culea M., *Determination of amino acid composition of two carp species by GC-MS*, Asian J Chem, 2011, Vol. 23(11), pp. 4757-4760
5. Iordache A-M., Culea M., Horj E., Cozar O., *Determination of amino acids and selenium in fish plasma*, Rom Reports Phys, 2011, Vol. 56(7-8), pp. 963-970, [http://www.nipne.ro/rjp/2011\\_56\\_7-8/0963\\_0970.pdf](http://www.nipne.ro/rjp/2011_56_7-8/0963_0970.pdf)
6. **Șuvar S.**, Horj E., Podea P., Iordache A., Cocan D., Culea M., *Fatty acids determination in trout plasma and meat by GC-MS*, 2015, Studia Universitatis Babeș-Bolyai Chemia, Vol. 60(2), pp. 109-116
7. Abu E.O., Oluwatowoju I., *Omega-3 index determined by gas chromatography with electron impact mass spectrometry*, Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids, 2009, Vol. 80(4), pp. 189-194
8. Chukwuemeka U., Ndukwe G.I., Audu T.O., *Comparison of Fatty Acids Profile of Some Freshwater and Marine Fishes*, Internet J Food Safety, 2008, Vol. 10, pp. 9-17
9. Aras N.M., Haliloğlu H.İ., Ayik Ö., *Comparison of Fatty Acid Profiles of Different Tissues of Mature Trout (*Salmo trutta labrax*, Pallas, 1811) Caught from Kazandere Creek in the Çoruh Region, Erzurum, Turkey*, Turkish J Vet Anim Sci, 2014, Vol. 27(2), pp. 311-316
10. Booth R.K., McKinley R.S., Ballantyne J.S., *Plasma non-esterified fatty acid profiles in wild Atlantic salmon during their freshwater migration and spawning*, J Fish Biol, 2005, Vol 55(2), pp. 260-273
11. Henderson R.J., *Fatty acid metabolism in freshwater fish with particular reference to polyunsaturated fatty acids*, Arch Tierernahr, 1996, Vol. 49(1), pp. 5-22
12. Simopoulos A.P., *Evolutionary aspects of diet, essential fatty acids and cardiovascular disease*, Eur Hear Journal, Suppl, 2001, Vol. 3(SUPPL.4), pp. D8-21,
13. Samal A.K., Nazar A.K.A., Jayakumar R., Tamilmani G., Sakthivel M., Rajendran P., et

- al., *Musculoskeletal abnormalities in hatchery reared silver pompano, Trachinotus blochii (Lacépède, 1801)*, 2014, Vol. 61(3), pp. 122-124
14. Cahu C., Infante J.Z., Takeuchi T., *Archimer Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae*, Aquaculture NOV, 2003, Vol. 227(4), pp. 254-258
  15. Hjartåker A., *Fish consumption and risk of breast, colorectal and prostate cancer: a critical evaluation of epidemiological studies*, Scand J Nutr, 2003, Vol. 47(3), pp. 111-122
  16. Kaba N., Yucel S., Baki B., *Comparative Analysis of Nutritive Composition, Fatty acids and Vitamin Contents of Wild and Cultured Gilthead Seabream (Sparus aurata)*, J Anim Vet Adv, 2009, Vol. 8(3), pp. 541-544
  17. Kandemir Ş., Polat N., *Seasonal Variation of Total Lipid and Total Fatty Acid in Muscle and Liver of Rainbow Trout ( Oncorhynchus mykiss W ., 1792 ) Reared in Derbent Dam Lake*, Turkish J Fish Aquat Sci, 2007, Vol. 7(1), pp. 27-31
  18. Stripp C., Overvad K., Christensen J., Thomsen B.L., Olsen A., Møller S., et al., *Fish Intake Is Positively Associated with Breast Cancer Incidence Rate*, J Nutr, 2003, Vol. 133(11), pp. 3664-3669
  19. Tocher D.R., *Metabolism and Functions of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish*, Rev Fish Sci, 2003, Vol. 11(2), pp. 107-184
  20. Voica C., Ionete R.E., Culea M., **Şuvar S.**, Iordache A-M., *Assessment of trace elements in fish tissues as tool for monitoring pollution in the aquatic ecosystem*, Chem Life, 2015, Vol. 13(45-162), pp. 78-80.
  21. Cocan D., Horj E., Culea M., Miresan V., Pintea A., *Amino Acids Levels of Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss) Plasma During Spring – Summer Seasons*, Bull Univ Agric Sci Vet Med Cluj-Napoca, Anim Sci Biotechnol, 2010, Vol. 67(1-2), <http://journals.usamvcluj.ro/index.php/zootehnie/article/view/5261>
  22. **Şuvar S.**, Pătruţ R., Lăcătuş M., Sitar C., Culea M., *Comparison of nutrients composition of some vegetable oils*, Chem Life, 2015, Vol. 13(2), pp. 146-148
  23. Podea P., Donca I., **Şuvar S.**, Culea M., Irimie F.D., *Extraction and analysis of essential oils from Cuminum Cyminum and Carum Carvi seeds*, Vol. 37 14th International Symposium and Summer School on Bioanalysis Bratislava – Smolenice ; 2014
  24. **Şuvar S.**, Bleiziffer R., Podea P., Iordache A., Voica C., Zgavarogea R., Culea M., *A Comparative Mass Spectrometric Study of Fatty Acids and Metals in Some Seed Extracts*, Eur J Mass Spectrom, 2016, Vol. 22(5), pp. 253-260, Valabil la: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1255/ejms.1448>
  25. El-Beltagi H.S., Salama Z., El-Hariri D.M., *Evaluation of Fatty Acids Profile and the Content of Some Secondary Metabolites in Seeds of Different Flax Cultivars ( Linum Usitatissimum L .)*, Gen Appl Plant Physiol, 2007, Vol. 33(4), pp. 187-202
  26. Bucher H.C., Hengstler P., Schindler C., Meier G., *N-3 polyunsaturated fatty acids in coronary heart disease: a meta-analysis of randomized controlled trials*, Am J Med, 2002, Vol. 112(4), pp. 298-304