

**AUTENTIFICAREA VINURILOR SI STABILIREA COMPOZITIEI ULEIURILOR
VEGETALE ROMANESTI, PRIN METODE FIZICE PERFORMANTE**

(¹H-RMN, ¹³C-RMN, GC-SM)

Proiect CNCISIS nr. 240/01.10.2007-2010, Cod. ID 928

Prezentul proiect vizeaza elaborarea unor metode de analiza instrumentala si compositionala prin metode fizice moderne (¹H-RMN, ¹³C-RMN, GC-SM). Este propusa o metoda de autentificare a vinurilor romanesti bazata pe o tehnica experimentală nelaborioasa (inregistrarea spectrului 1h-rmn direct pe o proba de vin, fara prelucrare prealabila) urmata de o prelucrare a datelor prin metode chemometrice originale sau descrise in matematica statistica. Pe aceasta cale este posibila autentificarea vinurilor dupa soi, provenienta geografica si recolta, precum si depistarea adulterarilor sau cupajelor. Este propusa deasemeni o metodologie de stabilire a autenticitatii vinurilor pe baza analizei gc-ms a unor extracte de vin in solventi organici.

Proiectul vizeaza deasemeni stabilirea compozitiei pe tipuri de acizi a uleiurilor vegetale romanesti folosind metode ¹H-RMN si GC-MS si o autentificare a uleiului de floarea soarelui dupa caracteristici de provenienta biologica, geografica si tehnologica. Sunt incluse si obiectivele de dozare a acizilor trans in uleiuri tratate termic precum si functionalizarea acizilor nesaturati (pe modelul acidului oleic) prin grefarea unor mostre structurale de cromofori si antioxidanti.

**AUTHENTICATION OF ROMANIAN WINES AND COMPOSITION ANALYSIS OF
ROMANIAN VEGETABLE OILS BY MODERN PHYSICAL METHODS
(NMR, GC-MS)**

This project aims to elaborate some methods for the structural and compositional analysis by modern physical methods (¹H-NMR, ¹³C-NMR, GC-MS). A method is proposed for the Romanian wine authentication based on an easy experimental technique (directly recording the H-NMR spectrum of a wine sample, without any prior sample preparation), followed by original chemometric data processing or described in statistical mathematics (PCA-Principal Component Analysis). In this manner it is possible to authenticate the wines in terms of variety, geographical origin and crops, as well as to find out mixtures and adulterations. It is also proposed a methodology to establish wine authenticity by means of the GC-MS analysis of some wine extracts in organic solvents.

The present project aims also to establish the composition in terms of types of fatty acids of the Romanian vegetable oils, using the GC-MS and H-NMR method and to authenticate the sunflower oil by means of biologic, geographical and technological origin characteristics. Others objectives such as to establish the trans fatty acid content in thermally treated oils as well as the fictionalization of the unsaturated fatty acids (working on oleic acid as a model) by grafting some chromophoric and antioxidant structural motifs are also included.

Pentru prima faza a acestui proiect s-au propus doua obiective majore, conform datelor prezentate în Planul Proiectului. Acestea sunt dupa cum urmeaza:

1. Obiectiv propus și realizat: Crearea unei banci de mostre de vinuri romanesti de diferite soiuri și podgorii de provenienta din recolta 2007 și urmarirea procesului de fermentatie prin analiza compositionala $^1\text{H-RMN}$

Indeplinirea acestui obiectiv a urmarit trei activitati principale:

Colectarea mostrelor autentice de must pe soiuri și podgorii

În vederea indeplinirii acestei activitati au fost colectate musturi obtinute numai din struguri din soiurile Merlot, Cabernet Sauvignon cât și Feteasca Neagra, soi specific romanesc, cultivate în zona viticola Valea Calugareasca. Aceste probe au fost supuse fermentarii sub influenta drojdiilor naturale cât și fermentarii cu adaos de drojdii fermentative.

Algeera acestor soiuri a fost determinata de doi factori importanti, specificitatea zonei viticole Valea Calugareasca (recunoscuta pentru calitatea deosebita a vinurilor rosii) cât și datorita aprecierii pe piata a acestor soiuri de vin.

1.2 Inregistrarea spectrelor $^1\text{H-RMN}$ la 5 intervale regulate din perioada de fermentatie

Pentru o urmarire sistematica a procesului fermentatiei alcoolice naturale a vinului, au fost alese 5 momente distincte de inregistrare a spectrelor $^1\text{H-RMN}$, în functie de modificarile care se produc în compozitia mustului, folosind experienta acumulata anterior.

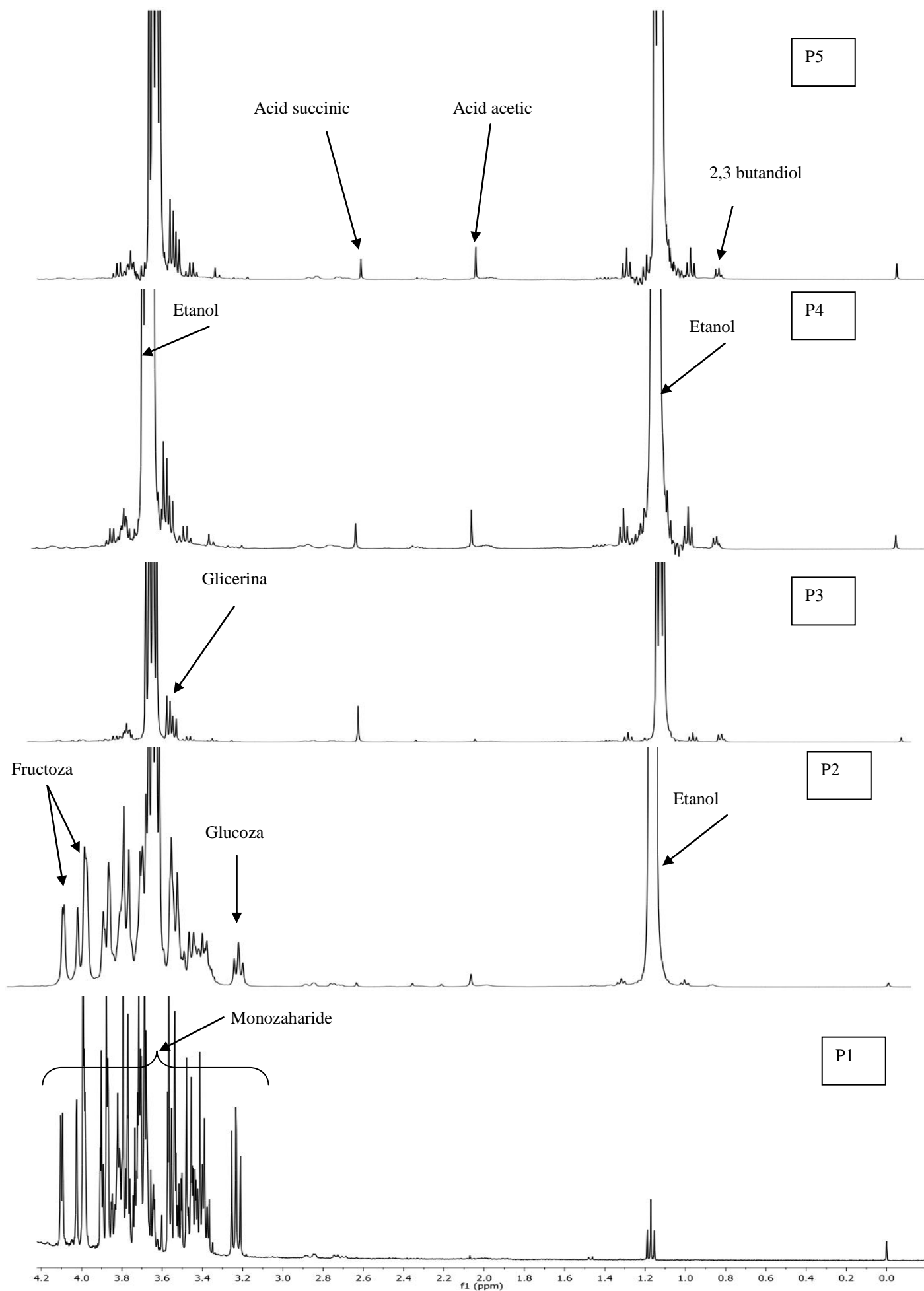
Spre exemplificare în figura 1 sunt prezentate spectrele $^1\text{H-RMN}$ obtinute în timpul fermentatiei alcoolice a mustului Feteasca Neagra.

Cele cinci momente alese pentru inregistrarea spectrelor $^1\text{H-RMN}$ sunt prezentate în tabelul 1. Pentru toate vinurile luate în studiu au fost inregistrate spectrele cu aceeasi regularitate. Masurarea timpului de fermentare scurs între inregistrari s-a facut în ore, abaterile fiind de maxim ± 10 minute.

Tabel 1. Momentul inregistrării spectrelor $^1\text{H-RMN}$ pe parcursul desfasurării fermentării

Nr. Crt.	Proba	Timpul de fermentare (zile)
1.	P1	0 – inceputul fermentării alcoolice
2.	P2	2
3.	P3	3
4.	P4	4
5.	P5	15 – incheierea fermentatiei alcoolice

Dozarea componentelor pe parcursul procesului fermentativ s-a efectuat pe baza markerilor stabiliti pentru fiecare componente în parte. În figura 1 sunt prezentate cateva semnale utilizate ca marker pentru diferite substante componente ale mustului și respectiv vinului. Se poate observa din figura 1 cum se consuma pe parcursul fermentatiei monozaharidele, formandu-se etanol și alte componente în reactii paralele (glicerina, acid succinic, acid acetic, 2,3 butandiol, etc.).



Figură 1. Spectrele ^1H -RMN înregistrate în timpul fermentării naturale a unui vin soiul Feteasca Neagra

În toate cazurile studiate fermentația alcoolică desaturată sub influența drojdiilor naturale s-a încheiat în aproximativ 15 zile. Au existat diferențe de ± 1 zi de la un soi de vin la altul. Pentru lotul luat în studiu, fermentația alcoolică naturală s-a încheiat în 15 zile pentru soiurile Feteasca Neagră și Merlot și în 16 zile pentru soiul Cabernet Sauvignon

Intrucât o practică tot mai întâlnită în procesarea industrială a vinului prevede utilizarea unor drojdii selecționate pentru fermentarea vinului, au fost studiate mostrele de must luate în studiu și prin inducerea fermentării prin adăugarea de drojdii. Drojdiile folosite au fost de tipul *Sacharomyces cerevisiae*. În cazul fermentării induse perioada de fermentare s-a redus la 3 zile, în parte datorită faptului că s-a utilizat o cantitate de drojdii mai mare decât cea care se găsește în mod natural pe suprafața bobului de strugure (la 20 mL must s-au adăugat 0.5g drojdie). Scurtarea timpului de fermentare are loc și în cazul fermentării industriale a vinului, în urma adăugării de drojdii selecționate.

1.3 Interpretarea datelor în termenii variației compoziționale pe produși cu structura cunoscută

Dozarea componentelor s-a efectuat față de standardul intern TSP (trimetilșililpropionatul de sodiu) introdus în solventul deuterat în concentrație cunoscută 10 mM/L. În probele de must supuse analizei au fost dozate monozaharidele fermentescibile (glucoza și fuctoza) folosind markerii: dubletul de la 4.1 ppm pentru fructoza și respectiv tripletul de la 3.2 ppm corespunzător glucozei.

Dintre soiurile de must luate în studiu cea mai mică cantitate de zaharuri a prezentat soiul Cabernet Sauvignon (cu un conținut inițial de zaharuri de 254 g/L), iar cel mai bogat în zaharuri a fost soiul Feteasca Neagră (cu un conținut total de zaharuri de 266,5 g/L).

Spectrele înregistrate la diferiți timpi arată că, în afară de creșterea cantității de etanol pe seama consumului de zaharuri, se observă și modificări ale concentrațiilor altor substanțe în timpul fermentației (figura 1). Are loc creșterea cantității de acid acetic, care are drept marker semnalul de la 2.1 ppm și a cantității de acid succinic (marker pentru acest acid este picul de la 2.6 ppm). Și cantitatea de glicerină (picul de la 3.5 ppm) crește pe măsură ce se consumă glucoza. Dozarea acestor componente este importantă întrucât concentrația lor poate îmbunătăți sau poate deteriora caracteristicile organoleptice și calitative ale vinului.

S-a observat că în timpul fermentației naturale a mustului acidul acetic apare în probă, în cantități dozabile, după aproximativ 2-3 zile, acidul succinic după aproximativ 3-6 zile, iar glicerina poate fi dozată direct abia după 6-9 zile. Deși aceasta din urmă este vizibilă mai repede în spectru, sunt întâmpinate greutăți în dozarea ei datorită suprapunerii semnalelor de monozaharide peste cele ale glicerinei. Numarul de zile după care pot fi dozate anumite componente cât și cantitățile obținute în urma fermentației, sunt diferite de la un soi de vin la altul. Pentru probele de must luate în studiu s-au obținut în urma fermentației naturale cantități cuprinse între de 0.4 - 0.5 g/L de acid acetic, 0.4 - 0.6 g/L acid succinic și respectiv 6.9 - 7.8 g/L glicerina.

În urma fermentației alcoolice indusă cu ajutorul drojdiilor, s-a observat în toate cazurile obținerea unor cantități mai mari de etanol decât în cazul fermentației naturale. De asemenea s-au observat obținerea unor cantități similare de acid acetic, cu cele obținute prin fermentația naturală, și a unor cantități mai mari de acid succinic și respectiv glicerina, după cum poate fi observat în tabelul 2.

Tabel 2. Limitele de variație a compoziției vinului în funcție de tipul de fermentație

Tip fermentație	Concentrație (g/L)		
	acid acetic	acid succinic	glicerina
Naturală	0.4 - 0.5	0.4 - 0.6	6.9 - 7.8
Industrială (cu drojdii)	0.3 - 0.6	2.3 - 2.8	11.4 - 12.8

2. Obiectiv propus și realizat: Elaborarea procedurii de autentificare a vinurilor de diferite soiuri, podgorii (și recoltă, în masura disponibilităților) prin prelucrarea chemometrică originală a datelor furnizate de spectrele $^1\text{H-RMN}$

Îndeplinirea acestui obiectiv s-a desfășurat prin îndeplinirea a două activități importante:

2.1. Crearea bancii de mostre de vinuri roșii. Înregistrarea spectrelor $^1\text{H-RMN}$

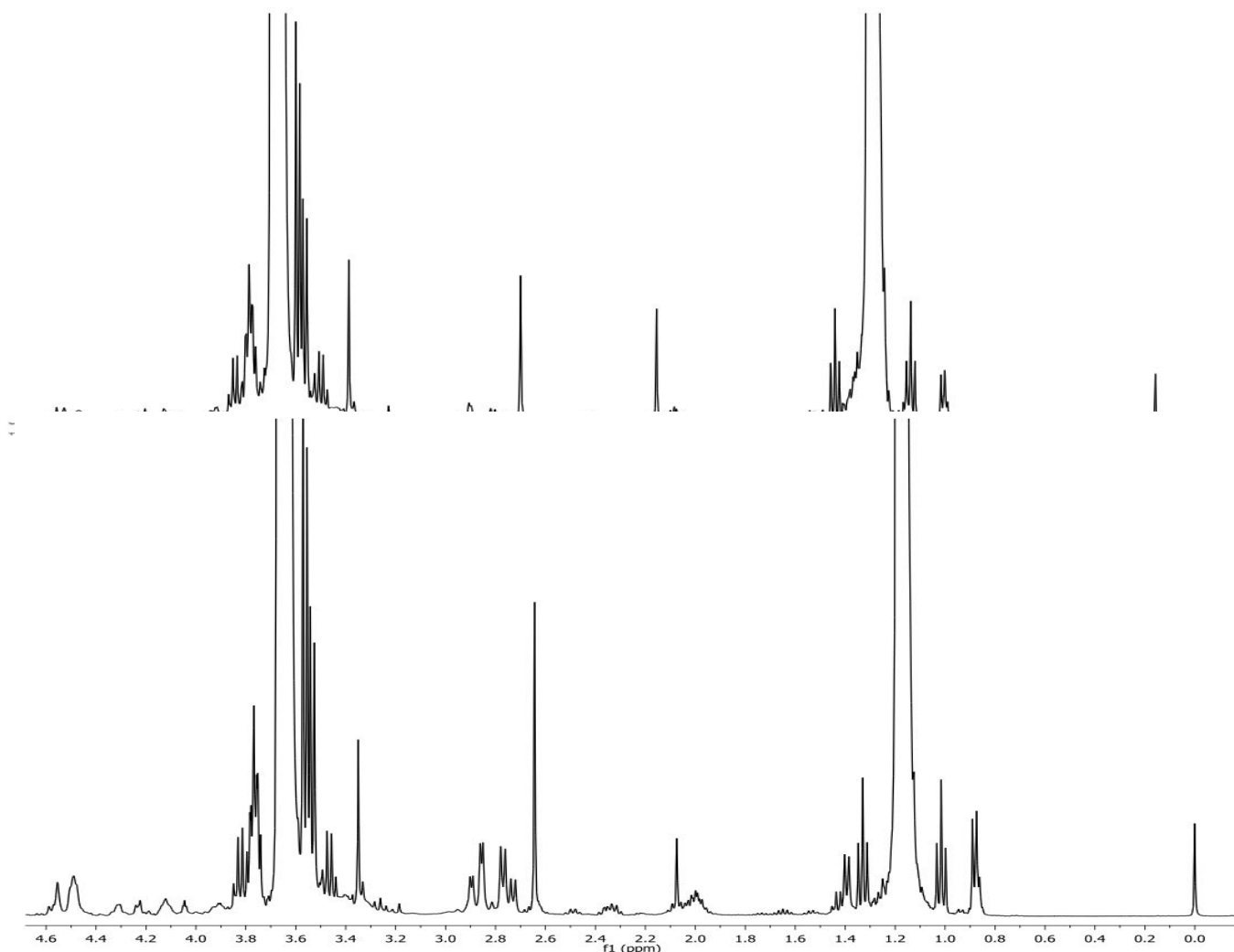
Pentru crearea bancii de mostre de vinuri românești au fost colectate atât vinuri roșii cât și vinuri albe produse în 2007, în zonele viticole Valea Calugareasca și Murfatlar. Au fost colecționate probe autentice de vin roșu din soiurile:

- Merlot (M)
- Cabernet Sauvignon (CS)
- Feteasca Neagra (FN)
- Pinot noir (PN)

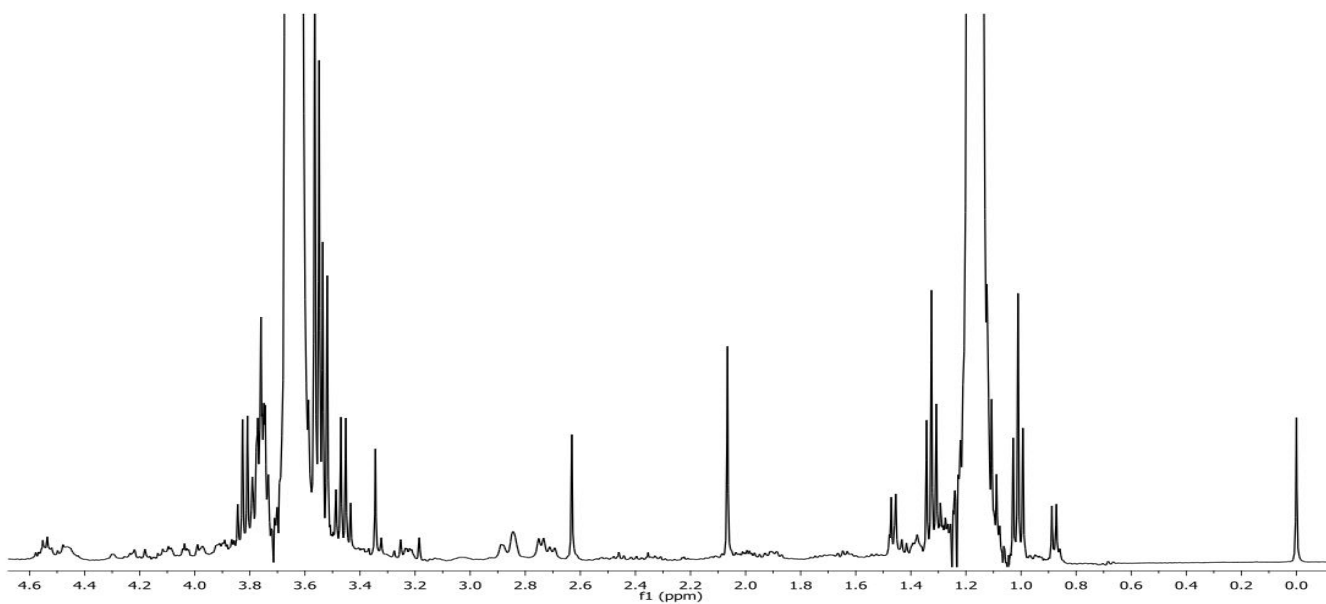
și respectiv probe autentice de vin alb din soiurile :

- Sauvignon (SB)
- Muscat Ottonel (MO)
- Pinot gris (PG)

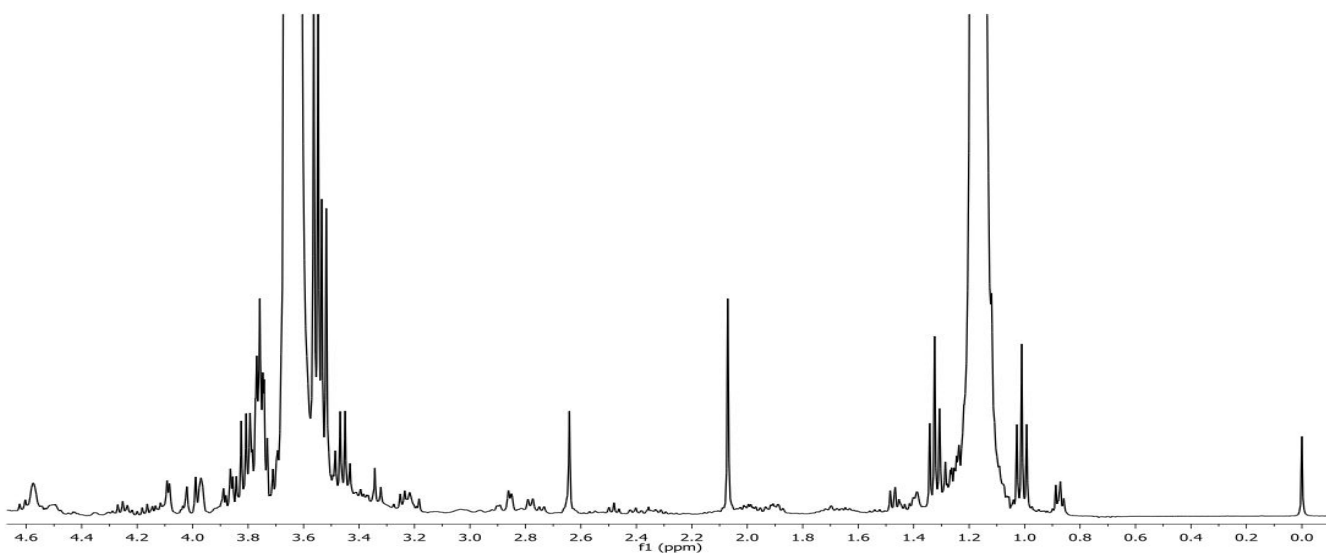
În figurile de la 2 până la 5 sunt prezentate profilurile generale ale spectrelor $^1\text{H-RMN}$, ale unora din probele studiate.



Figură 3. Zona 0 – 4.6 ppm a spectrului $^1\text{H-RMN}$ a unei probe de vin roșu, soiul Cabernet Sauvignon



Figură 4. Zona 0 – 4.6 ppm a spectrului ^1H -RMN a unei probe de vin alb, soiul Muscat Ottonel



Figură 5. Zona 0 – 4.6 ppm a spectrului ^1H -RMN a unei probe de vin alb, soiul Pinot gris

Se poate observa ca de la un soi de vin la altul compoziția este similară, profilul general al probei este asemănător, dar pot fi observate și mici diferențe, mai ales de concentrație, care prin cuantificare dau „amprenta soiului” respectiv permițând autentificarea vinurilor.

2.2. Prelucrarea chemometrică a datelor

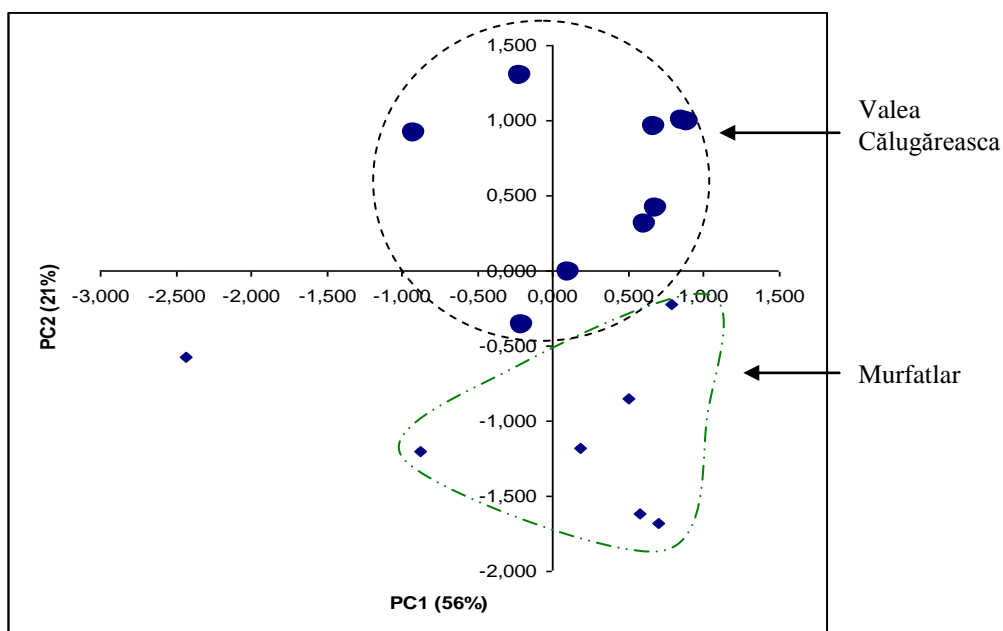
Prelucrarea chemometrică a datelor este modalitatea prin care sunt cuantificate în mod sistematic diferențele care apar în spectrele ^1H -RMN pentru soiurile de vin luate în studiu. În prelucrarea chemometrică a datelor sunt urmărite două direcții principale:

- prima presupune utilizarea informațiilor cu privire la concentrația diferitelor componente identificate și dozate în vin, obținute din fiecare spectru ^1H -RMN
- a doua presupune transformarea fiecărui spectru ^1H -RMN într-un sir de valori obținut prin integrarea spectrului pe ferestre spectrale înguste (de 0.2 ppm). Acest lucru permite obținerea a 49 de variabile pentru fiecare spectru ^1H -RMN. Se elimină din spectrul ^1H -RMN

zona 4,7 - 5,1 ppm datorită proximității semnalului suprimat al apei, care poate duce la rezultate eronate, generate de procedura de suprimarea a semnalului apei, procedură care poate afecta semnalele aflate în imediata vecinătate a acestuia. Integrarea s-a realizat de două ori, pe intervale intercalate, pentru fiecare spectru $^1\text{H-RMN}$, urmărind eliminarea micilor variații ale poziției semnalelor în spectru, generata de micile diferențe de pH și respectiv de concentrație.

Prelucrarea chemometrică s-a desfășurat pe două căi paralele.

Una dintre căi s-a bazat pe utilizarea metodei PCA (metoda chemometrică des utilizată în interpretarea datelor bazându-se pe calcule de statistică matematică). În urma acestei analize a datelor s-a observat că prin reprezentarea PC1 funcție de PC2 se obține o grupare a probelor de vin în funcție de podgoria de proveniență, iar prin reprezentarea PC1 funcție de PC3 se obține o grupare a probelor funcție de soiul de vin. Astfel se poate observa că vinurile produse la Murfatlar se grupează pe zona valorilor negative pentru PC2 și preferențial pozitive pentru PC1 (punctele marcate cu romb în figura 6). Se observă, de asemenea, că vinurile produse la Valea Călugărească se grupează cu precădere în zona valorilor pozitive ale lui PC2, cu o tendință mai mare către valorile pozitive ale lui PC1 (punctele marcate cu rotund).



Figură 6. Reprezentarea scorurilor corespunzătoare primelor 2 componente principale

Cea de-a doua cale de analiză a datelor presupune utilizarea unei metode proprii de calcul, metoda „zonelor de certitudine”. Aceasta metodă permite diferențierea vinurilor două câte două. Utilizarea ei este importantă deoarece permite diferențierea între vinuri care au compoziție destul de apropiată. Rezultate bune s-au obținut la diferențierea între vinurile roșii. S-a observat că dintre vinurile roșii studiate (M, PN, CS și FN), numai pe baza compoziției în compuși cu structură cunoscută se pot cu ușurință distinge două grupe: PN și M pe de o parte, datorită resturilor de monozaharide din compoziție, și CS și FN pe de altă parte. Problema ridicată a fost cum se pot diferenția FN și CS care au o compoziție asemănătoare și nu prezintă componente distincte. Această problemă poate fi rezolvată prin metoda „zonelor de certitudine” care presupune efectuarea unor calcule matematice. Dacă se iau în considerare vinurile CS și FN și se consideră un component care există, valorile integrale curente I_i^x , pentru un număr de n probe. Se calculează:

- Integrala medie pentru componentul x: $I_m^x = \frac{\sum I_i^x}{n}$
- Deviația standard $DS^x = \sqrt{\frac{\sum (I_i^x - I_m^x)^2}{n-1}}$
- Coeficientul „de încredere”: $C^x = \frac{I_m^x - 2DS^x}{I_m^x} = 1 - \frac{2DS^x}{I_m^x}$

Se calculează apoi „media integralelor medii” pentru cele 2 tipuri de vin FN și CS, care reprezintă „punctul de incertitudine maximă” $P_i^x = \frac{(I_m^x)_{CS} + (I_m^x)_{FN}}{2}$

Se consideră acum o anumită probă al cărei soi (CS sau FN) vrem să îl stabilim. Acesta are pentru un component x valoarea integralei I_i^x . Se calculează mărimea numită „relevanță”: $R^x = \frac{I_i^x - P_i^x}{P_i^x}$. Dacă valoarea I_i^x este mai apropiată de valoarea $(I_m^x)_{CS}$ decât de $(I_m^x)_{FN}$, atunci R^x va avea valori pozitive, iar dacă este mai aproape de $(I_m^x)_{FN}$ atunci va avea valori negative.

Se calculează apoi mărimea numită „relevanța corectată”. În cazul valorilor R^x pozitive se calculează: $R_c^x = R^x * (C^x)_{CS}$, iar în cazul valorilor R^x negative se calculează:

$$R_c^x = R^x * (C^x)_{FN}$$

Se însumează apoi valorile R_c^x pentru toate componentele identificate ($x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$) din vinul examinat obținând pentru fiecare probă „relevanța totală” $R_T = \sum R_c^x$

Valorile pozitive arată apartenența la CS, iar cele negative la FN. Cu cât valoarea este mai mare cu atât arată o atribuție mai sigură. În urma analizei probelor de vin din soiurile menționate s-au obținut valori ale relevanței totale pentru vinurile CS cuprinse între 1-0.1, iar pentru vinurile FN cuprinse între -0.5 - -0.09.

Modul de înregistrare a spectrelor RMN

Spectrele RMN au fost înregistrate folosind un spectrometru Bruker Avance DRX 400, în pulsuri, cu transformată Fourier, echipat cu gradienti de câmp pe axa z, operând la câmpul de 9.4 Tesla, corespunzător frecvențelor de 400 MHz pentru nucleul 1H și 100 MHz pentru nucleul ^{13}C . Pentru acest spectrometru a fost folosit un cap de probă multinuclear cu două canale și detecție inversă.

Spectrele au fost înregistrate folosind tuburi RMN de 5 mm de calitate Norell 507.

Spectrele pentru vinuri și musturi au fost înregistrate în concentrație 1: 9 (D₂O : vin) raport volumic. Deplasările chimice au fost exprimate în valori δ (ppm), utilizând ca referința TSP (0.00 ppm) pentru spectrele 1H -RMN. Parametrii tipici pentru spectrele 1H -RMN înregistrate cu spectrometrul Avance 400 au fost: puls 35°, fără atenuarea puterii, timp de achiziție 4s, fereastra spectrală 6.4 KHz, număr de scani 16, număr de puncte înregistrate 52K. FID-ul nu a fost procesat înainte de transformarea Fourier. Durata medie de înregistrare a unui spectru 1H -RMN (cu sau fără suprimarea semnalului apei) este de aproximativ 4 minute.

Înregistrarea spectrelor RMN se face cu ajutorul spectrometrului Bruker Avance 400 folosind programul Top Spin.

In concluzie a fost creată o banca de mostre de vinuri românești de diferite soiuri și podgorii de proveniență din recolta 2007. A fost urmărit procesul de fermentație alcoolică a mustului prin analiza compozițională 1H -RMN și s-au stabilit componentele care provin în vin din must și cele care se formează în timpul procesului fermentativ. A fost elaborată o procedură de autentificare a vinurilor de diferite soiuri, podgorii prin prelucrarea chemometrică originală a datelor furnizate de spectrele 1H -RMN.

Pentru faza unica a proiectului care s-a desfășurat în anul 2008, s-au propus patru obiective majore conform datelor prezentate în Planul Proiectului. Aceste obiective sunt următoarele:

- 1. Obiectiv propus și realizat: Analiza compozițională a vinurilor din banca de mostre creată prin obiectivul 1, la 1 an de învechire, prin spectrometrie $^1\text{H-RMN}$**
Îndeplinirea acestui obiectiv a urmărit două activități principale:

1.1. Înregistrarea spectrelor $^1\text{H-RMN}$

Înregistrarea spectrelor $^1\text{H-RMN}$ pentru probele de vin aflate în baza de date a fost realizată urmând procedura stabilită și raportată anul anterior (probele de vin sunt analizate direct fără efectuarea unor prelucrări prealabile; probei supusă analizei RMN i se adaugă doar 10% solvent deuterat). Spectrele RMN au fost înregistrate cu ajutorul instrumentului Bruker Avance DRX 400.

1.2. Prelucrarea chemometrică a datelor (sarcinile acestui obiectiv se reiau anual)

Datele spectrale obținute în urma activității de la punctul 1.1 au fost prelucrate chemometric urmând două abordări:

- utilizarea valorilor numerice corespunzătoare componentelor identificate și dozate în proba de vin prin metoda RMN
- transformând spectrul $^1\text{H-RMN}$ într-un sir de 49 de valori obținut prin integrarea spectrului pe ferestre înguste de 0.2 ppm

Au fost utilizate programe computerizate (StatistiXL și The Unscrambler) pentru analiza chemometrică a datelor folosind metode statistice de tipul PCA și HCA. Au fost analizate probele de vin provenite din podgoriile Valea Călugărească și Murfatlar. Probele din cele două podgorii au fost analizate separat în funcție de culoare: vin roșu (soiurile Cabernet Sauvignon, Merlot, Fetească Neagră și Pinot Noir) și respectiv vin alb (soiurile Sauvignon Blanc, Chardonnay, Pinot Gris, Muscat Ottonel, Riesling Italian și Tămâioasa Românească).

După numai un an de învechire nu au putut fi observate modificări compoziționale majore din punctul de vedere al analizei $^1\text{H-RMN}$.

În urma analizei chemometrice de tipul PCA a datelor s-au obținut grupări ale probelor în funcție de podgorie; spre exemplu în *figura 1* este redată reprezentarea grafică (PCA 1 funcție de PCA 2) a diferențierii vinurilor roșii funcție de zona viticolă. Se poate observa că probele de vin roșu de la Valea Călugărească sunt grupate la valori pozitive ale lui PC1, iar cele de la Murfatlar la valori negative ale PC1.

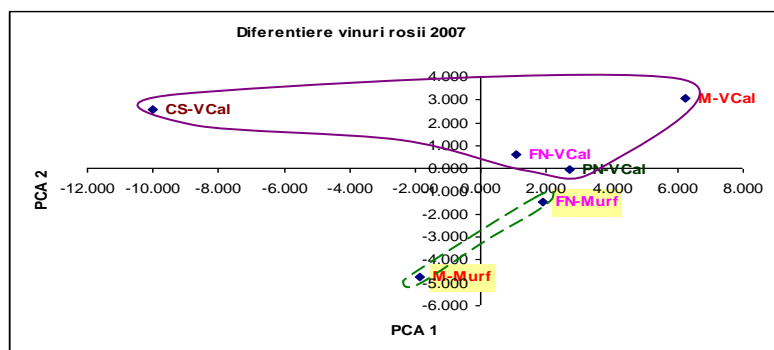


Figura 1. Reprezentarea grafică a valorilor PC1 funcție de PC2

2. Obiectiv propus și realizat: Elaborarea procedurii de analiza compozițională a uleiurilor vegetale produse în România, prin prelucrarea chemometrică originală a datelor furnizate de spectrele $^1\text{H-RMN}$

Îndeplinirea acestui obiectiv s-a desfășurat prin îndeplinirea a două activități importante:

2.1. Crearea băncii de mostre de uleiuri vegetale din producția românească

Banca de mostre de uleiuri vegetale românești a fost creată prin extracția uleiului din semințe oleaginoase românești autentice (floarea-soarelui, soia, rapița și in) procurate de la Institutul Național de Cercetare - Dezvoltare pentru Agricultură (INCD) - Fundulea și de la Stațiunile de Cercetare - Dezvoltare Agricolă regionale. Pentru probele cuprinse în baza de date se cunosc cu exactitate soiul, anul recoltei și regiunea geografică de proveniență. Compoziția băncii de semințe este redată în *Tabelul 1* :

Tabelul 1: Banca de semințe oleaginoase românești autentice

Nr. Crt.	Statiunea de cercetare	Semințe	Anul recoltei	Nr. probe
1.	I.N.C.D.A. Fundulea	soia	2005	6
2.			2006	7
3.			2007	6
4.		floarea-soarelui	2007	7
5.		in	2005	6
6.			2006	6
7.		rapița	2007	5
8.	SCDA Simnic (Craiova)	floarea-soarelui	2007	6
9.		rapița	2007	6
10.	SCDA Lovrin (Timis)	floarea-soarelui	2007	2
11.		rapița	2007	2
12.		soia	2007	2
13.	SCDA Podu Iloaiei (Iasi)	floarea-soarelui	2007	4
14.	SCDA Valu-Traian (Constanta)	floarea-soarelui	2007	1
15.		soia	2007	1
16.		rapița	2007	1
17.	SCDA Livada (Satu-Mare)	in	2005	2
18.			2006	2

Din aceste semințe, uleiul a fost extras fie continuu (floarea-soarelui, soia și rapița) - conform procedurii Soxhlet, fie la rece (pentru uleiul de in), pentru a se evita încălzirea îndelungată a acestuia, care poate conduce la transformări nedorite ale acizilor grași polinesaturați (oxidări, polimerizări).

Extracția continuă a uleiului s-a efectuat prin plasarea unei cantități cunoscute de semințe oleaginoase măcinate în prealabil într-un extractor lichid-solid și recircularea solventului (eter de petrol p.f. 40-60°C) timp de 6 ore, conform protocolului de analiză standard. *Extracția la rece* s-a efectuat utilizând ca solvent de extracție

eterul etilic. O cantitate cunoscută de semințe măcinate și solvent de extracție se agită timp de o oră, urmată de filtrare și evaporarea solventului.

2.2. Înregistrarea spectrelor $^1\text{H-RMN}$

Spectrele RMN au fost înregistrate folosind un spectrometru Bruker Avance DRX 400, în pulsuri, cu transformată Fourier, echipat cu gradienti de câmp pe axa z, operând la câmpul de 9.4 Tesla, corespunzător frecvențelor de 400 MHz pentru nucleul ^1H și 100 MHz pentru nucleul ^{13}C . Pentru acest spectrometru a fost folosit un cap de probă multinuclear cu două canale și detecție inversă.

Spectrele au fost înregistrate folosind tuburi RMN de 5 mm de calitate Norell 507.

Solventul deuterat folosit a fost cloroformul deuterat (CDCl_3). Concentrația probelor a fost de 50% ulei în CDCl_3 . Deplasările chimice au fost exprimate în valori δ (ppm), utilizând ca referința TMS (0.00 ppm) pentru spectrele $^1\text{H-RMN}$ și semnalul solventului CDCl_3 (77.01 ppm) pentru spectrele $^{13}\text{C-RMN}$.

3. **Obiectiv propus și realizat: Elaborarea procedurii de analiza compozițională a uleiurilor vegetale produse în România, prin prelucrarea chemometrică originală a datelor furnizate de spectrele ^1H -RMN**

3.1. **Prelucrarea chemometrică pentru deducerea compoziției pe clase de acizi grași și calcularea indicilor tehnologici; compararea cu indici tehnici determinați prin metode standard.**

Spectrele ^1H -RMN ale uleiurilor vegetale analizate au un profil general similar, diferind între ele prin intensitatea și valorile integralelor semnalelor. În figura 2 se prezintă un spectru ^1H -RMN tipic al unui ulei vegetal de soia, iar tabelul 2 prezintă atribuțiile semnalelor din acest spectru.

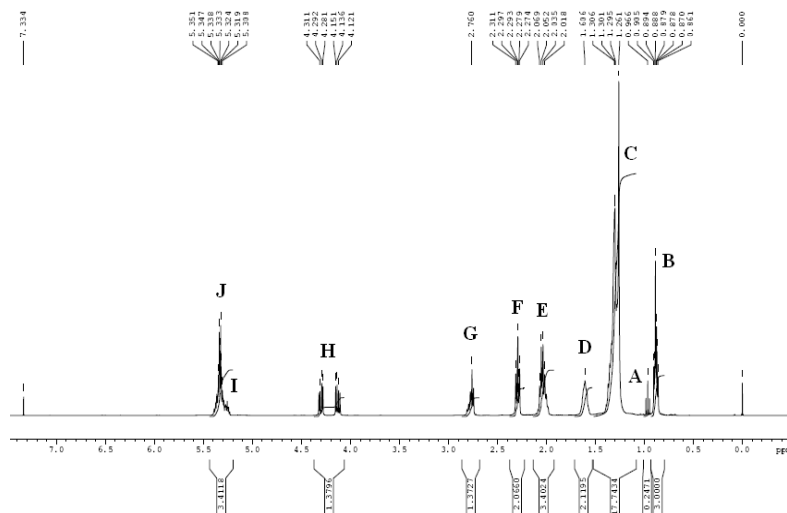


Figura 2. Spectrul ^1H -RMN al unui ulei de soia

Tabel 2: Deplasările chimice și atribuțiile semnalelor din spectrul ^1H -RMN al unui ulei vegetal

Semnal	δ (ppm)	Proton	Compus
A	0.95	$-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$	linolenic
B	0.85	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$	toți acizii grași cu excepția acidului linolenic
C	1.2	$-(\text{CH}_2)_n-$	toate lanțurile acil
D	1.6	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$	toate lanțurile acil
E	2.02	$-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$	protonii alilici (toți acizii grași nesaturați)
F	2.2	$-\text{CH}_2-\text{COOH}$	toate lanțurile acil
G	2.76	$-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$	protonii bis-alilici (linolenic și linolic)
H	4.19	$-\text{CH}_2\text{OCOR}$	glicerină (poziția α)
I	5.15	$-\text{CHOCOR}$	glicerină (poziția β)
J	5.29	$-\text{CH}=\text{CH}-$	toți acizii grași nesaturați

În compoziția trigliceridelor din uleiurile vegetale, glicerina este cel mai adesea esterificată cu:

- acizi grași cu trei duble legături (de exemplu: acid linolenic);
- acizi grași cu două duble legături (de exemplu: acid linolic);
- acizi grași mono-nesaturați (de exemplu: acid oleic, acid elaidic, acid palmitoleic, acid erucic etc.);
- acizi grași saturați (de exemplu: acid palmitic, acid stearic, acid miristic etc.).

În figura 3 se prezintă atribuțiile semnalelor ^1H -RMN pentru cele 4 tipuri de acizi grași de mai sus.

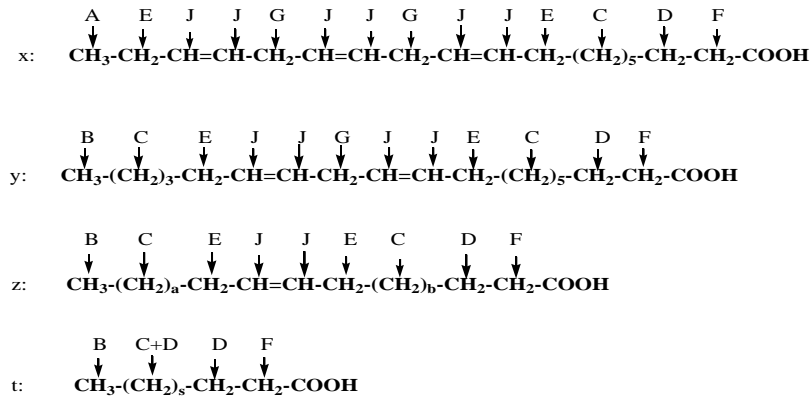


Figura 3. Atribuțiile semnalelor ¹H-RMN pentru cele 4 tipuri de acizi grași de mai sus

În ecuațiile chemometrice de determinare a compoziției uleiurilor pe clase de compuși s-au notat prin x , y , z , t fracțiile molare ale speciilor de mai sus. De asemenea, în calculele ce urmează, s-au notat prin I_A , I_B , I_C , I_D , I_E , I_F , I_G , I_H , I_I și I_J integralele semnalelor respective. Pentru o precizie mai bună, spectrele au fost integrate de două ori, iar fiecare integrală a fost calculată ca medie a celor două valori obținute la integrare.

Suma tuturor fracțiilor molare ale unui amestec fiind 1, obținem prima ecuație chemometrică:

$$x + y + z + t = 1 \quad (1)$$

Ecuații chemometrice deduse:

$$x = \frac{I_A}{I_A + I_B} \quad (2)$$

$$I_E = k \cdot 4 \cdot (x + y + z) \quad (3)$$

$$I_F = k \cdot 2 \cdot (x + y + z + t) = k \cdot 2 \cdot 1 \Rightarrow k = I_F / 2 \quad (4)$$

$$I_G = k \cdot 2 \cdot (2x + y) \quad (5), \text{ unde } k \text{ este o constanta a fiecărui spectru, reprezentând valoarea integralei unui proton.}$$

$$\text{Din ecuația (5) rezulta: } y = \frac{I_G - 4kx}{2k} \quad (6)$$

$$\text{Din ecuația (3) rezulta } z = \frac{I_E}{4k} - x - y \quad (7)$$

$$t = 1 - (x + y + z) \quad (8)$$

Ecuațiile (2), (6), (7) și (8) descriu compoziția uleiurilor pe cele 4 clase de acizi amintite (linolenic, linolic, mononesaturați și saturați).

Pentru o parte din uleiurile din banca creată la *Obiectivul 2.1*, compoziția pe cele 4 clase de compuși (dedusă din ecuațiile (2), (6), (7) și (8)) este redată în *figura 4*.

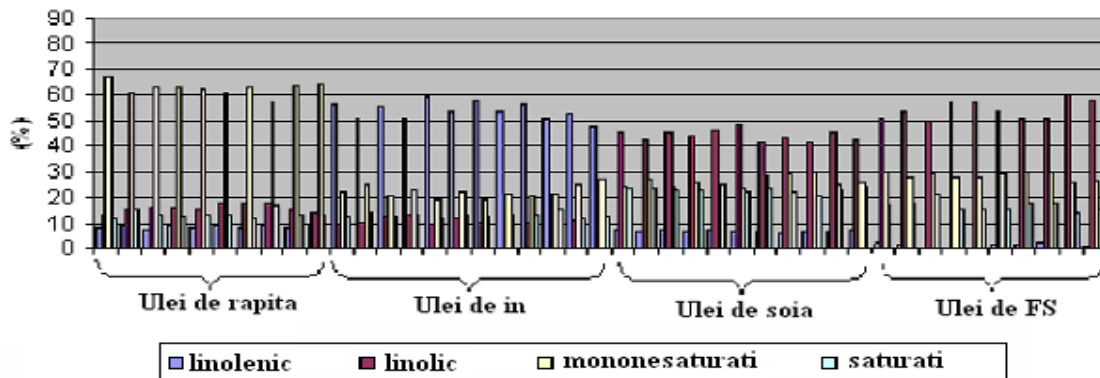
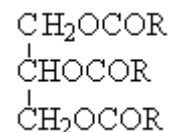


Figura 4. Compoziția uleiurilor în acid linolenic, acid linolic, acizi grași mononesaturați și acizi grași saturați

din spectrele ^1H -RMN ale uleiurilor se poate calcula indicele de iod al acestora, astfel:

Se considera ca uleiul respectiv este alcătuit dintr-un singur tip de trigliceride, cu formula de mai jos, unde R reprezintă un radical mediu de acid gras (media tuturor radicalilor de acizi grași din acel ulei). Se calculează:

- α = numărul de grupe $-\text{CH}_2-$ din radicalul mediu R;
 β = numărul de grupe $-\text{CH}=\text{CH}-$ din radicalul mediu R ;



$$\alpha = \frac{3}{2} \cdot \frac{I_C + I_D + I_E + I_F + I_G}{I_A + I_B}$$

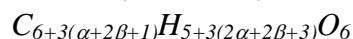
$$\beta = \frac{3}{2} \cdot \frac{I_J + I_I - I_H / 4}{I_A + I_B}$$

Rezulta : $n_C = \alpha + 2\beta + 1$

$$n_H = 2\alpha + 2\beta + 3$$

- Formula radicalului R: $C_{\alpha+2\beta+1}H_{2\alpha+2\beta+3}$

- Formula moleculara a trigliceridei ($C_6H_5O_6R_3$):



- Masa moleculara a trigliceridei, M_{TG} ;

- Nr. de moli pe gram de grăsime: $n = 1/M_{TG}$

- Nr. de moli de grupe $-\text{CH}=\text{CH}-$ conținute într-un gram de grăsime = $n \cdot 3 \cdot \beta$;

- Calculul indicelui de iod : $I_I = n \cdot 3 \cdot \beta \cdot 2 \cdot 127 \cdot 100$ (mg $I_2/100$ g grăsime).

Pentru o serie de uleiuri vegetale s-a determinat indicele de iod prin metoda RMN și s-au comparat valorile obținute cu cele determinate prin metoda clasică, prin titrare cu soluție de tiosulfat de sodiu. Valorile comparative sunt prezentate în *tabelul 3*:

Tabelul 3: Valorile indicelui de iod determinate prin metoda RMN și prin metoda clasică

Nr.	Ulei	I iod RMN	I iod STAS
1.	Cătină	63,4	63,8
2.	Dovleac	124,6	123,9
3.	Floarea-soarelui	121,6	122,0
4.	Germenii de grâu	128,9	130,7
7.	Sâmburi struguri	128,1	129,2
9.	Porumb	120,1	119,6
10.	Nuca	148,7	149,4
11.	Migdale dulci	99,0	99,6

4 Obiectiv propus și realizat: Funcționalizarea grăsimilor nesaturate; utilizarea ca model a oleatului de metil

Îndeplinirea acestui obiectiv s-a realizat prin îndeplinirea următoarele trei activități:

4.1 Obținerea unor intermediari reactivi cu structură de derivați halogenați

Pentru funcționalizarea grăsimilor nesaturate s-a avut în vedere utilizarea ca model a oleatului de metil (2). Din acesta pot rezulta o serie de intermediari reactivi cu structură de derivați halogenați, obținuți prin reacții de adiție de halogen, substituție în poziție alilică sau succesiune de transformări a grupei $-\text{COOH}$ în $-\text{CH}_2-\text{Br}$.

Oleatul de metil (2) a fost sintetizat prin esterificarea extractivă în 1,2-dicloroetan a acidului oleic (1). Prin adiția bromului la oleatul de metil, în CCl_4 , s-a obținut cu un randament de 86% intermediarul dihalogenat (3). Acesta a fost caracterizat prin înregistrarea spectrelor ^1H -RMN și IR (*figura 5*).

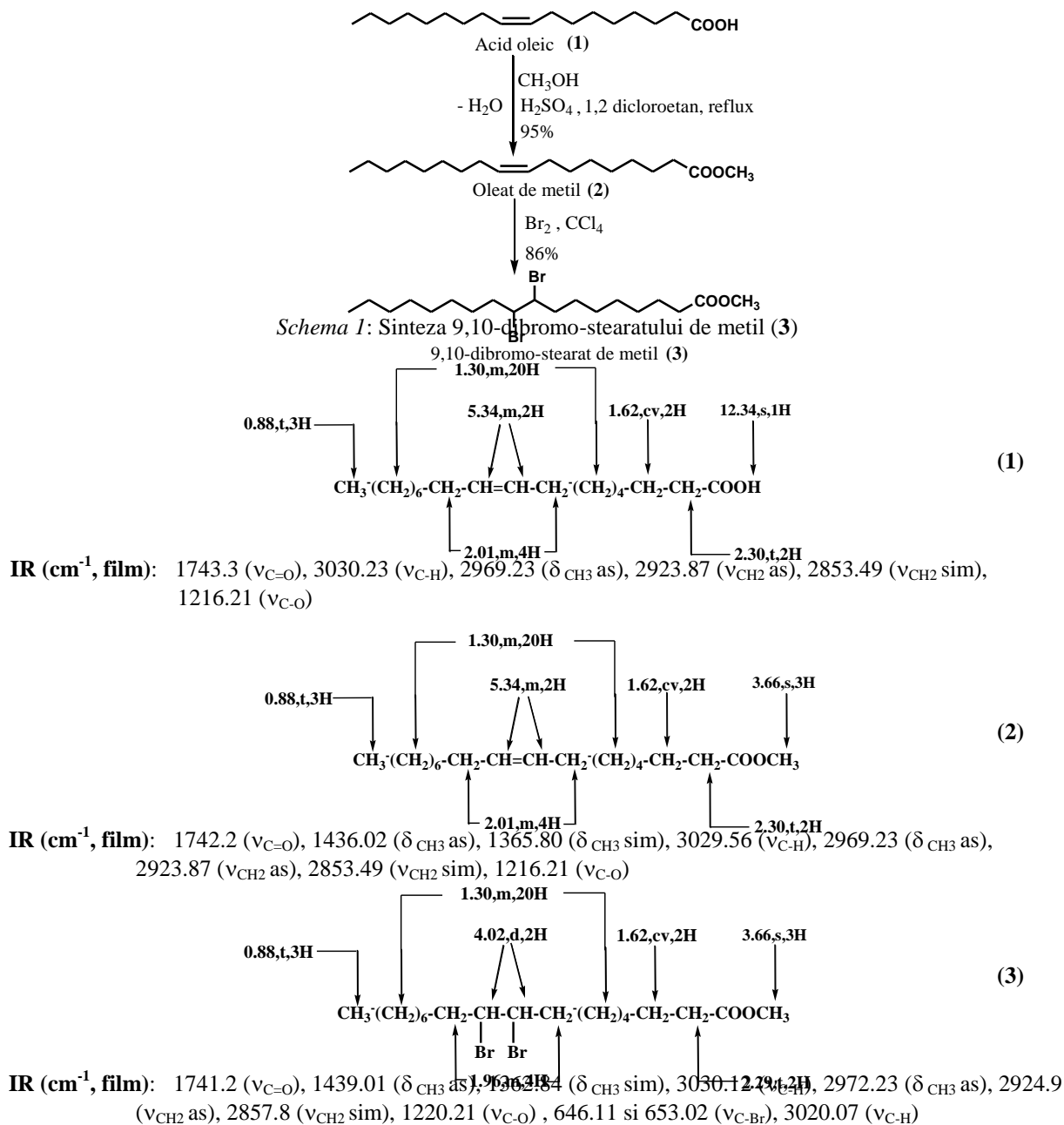
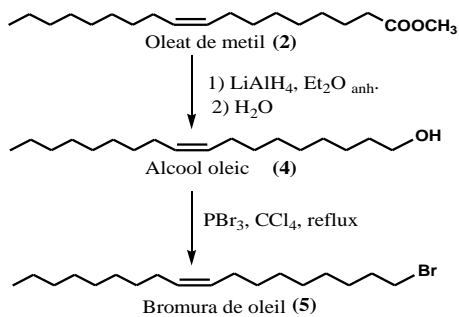


Figura 5: Atribuțiile spectrale ¹H-RMN(δ, ppm) si IR pentru compusii 1, 2 si 3.

Un alt compus cu structura de derivat halogenat (5) a fost sintetizat prin reducerea cu LiAlH₄ in Et₂O anhidru urmata de reacta cu PBr₃ in CCl₄ la reflux a oleatului de metil (2), conform *Schemei 2*:



Compușii (4) și (5) au fost caracterizați prin înregistrarea spectrelor $^1\text{H-RMN}$ și IR (figura 6).

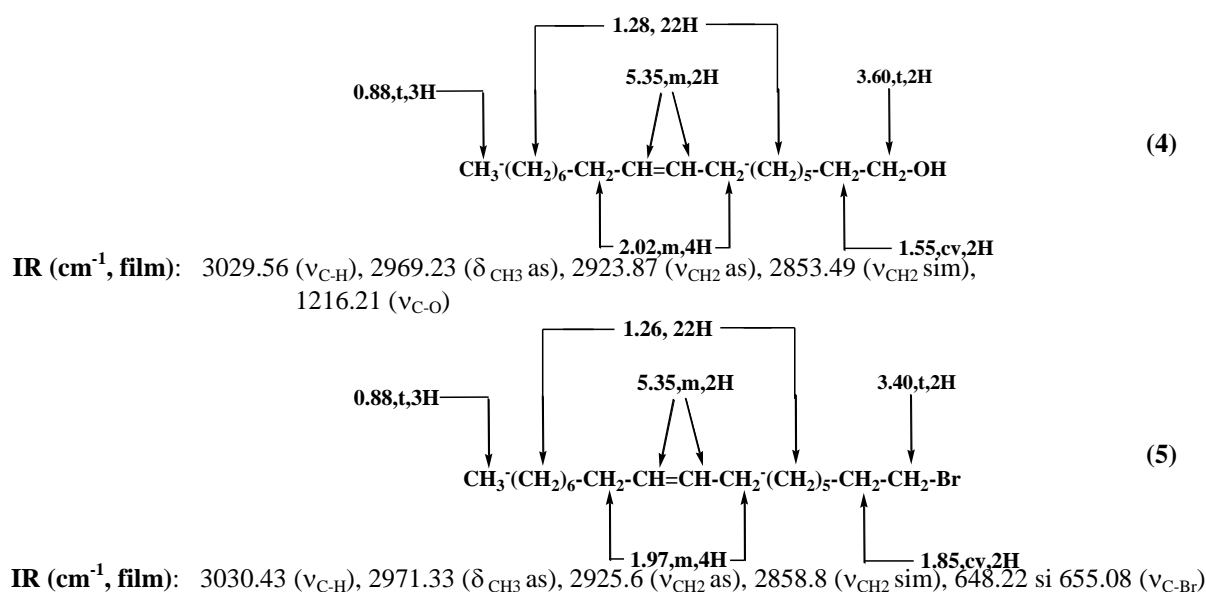
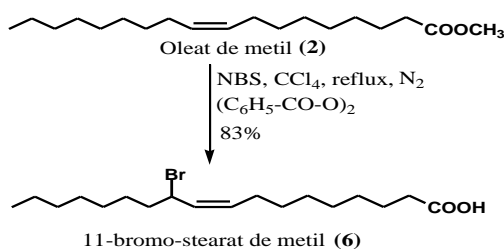


Figura 6: Atribuțiile spectrale $^1\text{H-RMN}$ (δ , ppm) și IR pentru compușii 4 și 5.

Un al treilea derivat halogenat (6) a fost sintetizat pornind tot de la oleatul de metil (2), prin substituție în poziție alilică cu N-bromosuccinimida (NBS) în CCl_4 în prezența de peroxid de benzoil ca inițiator al reacției radicalice, conform Schemei 3:



Schemea 3: Sinteza 11-bromo-stearatului de metil (6)

Compușul (6) a fost caracterizat prin înregistrarea spectrelor $^1\text{H-RMN}$ și IR (figura 7).

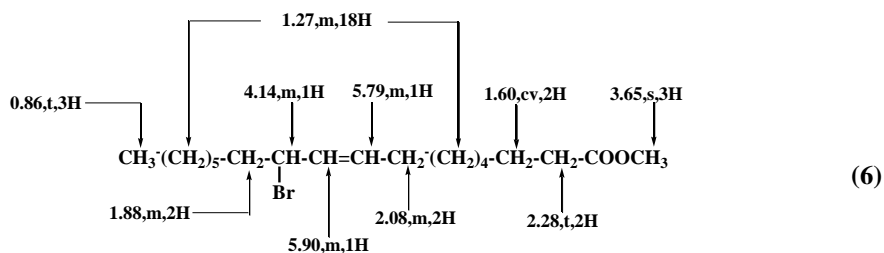
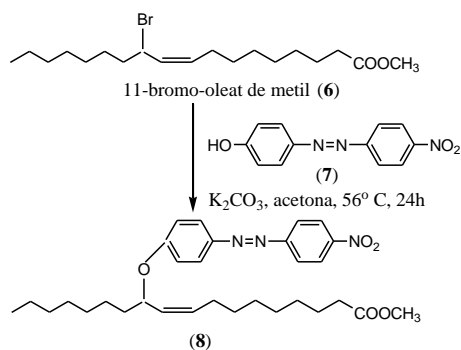


Figura 7: Atribuțiile spectrale $^1\text{H-RMN}$ (δ , ppm) pentru compusul 6.

4.2. Funcționalizarea prin grefare de unități structurale cromofore

Obiectivul grefării de unități cromofore pe catene hidrofobe s-a realizat prin reacția intermediarului bromurat reactiv (6) cu colorantul azoic (7) (sinteză tip Williamson) care a condus la obținerea compusului colorat portocaliu (8), conform Schemei 4. Compușul (8) a fost caracterizat prin înregistrarea spectrelor $^1\text{H-RMN}$ și IR.



Schema 4: Grefare de unități colorante pe catene hidrofobe.

4.3. Funcționalizare prin grefare de unități structurale cu proprietăți antioxidante

Obiectivul grefării de unități antioxidante pe catene hidrofobe s-a realizat prin reacțiile intermediarului bromurat reactiv (6) cu diverși polifenoli (sinteze tip Williamson), conform Schemei 5. Compușii rezultați au fost caracterizați prin înregistrarea spectrelor ¹H-RMN și IR.

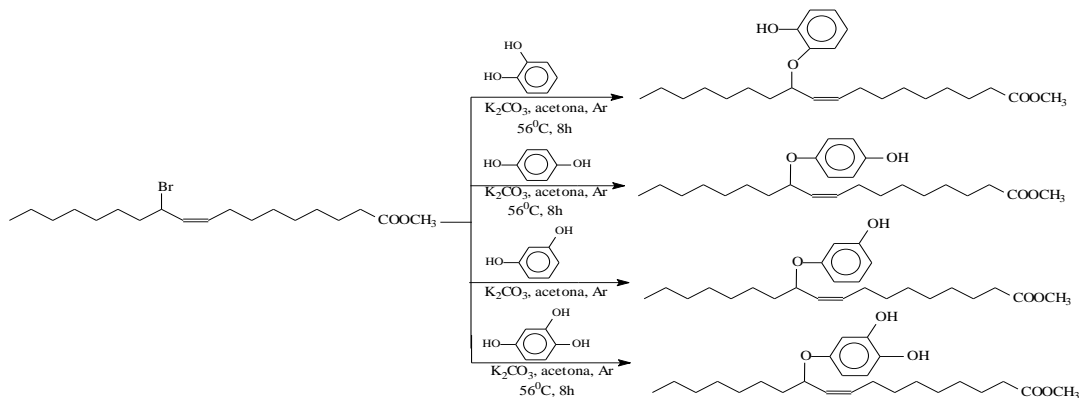


Figura 7

Schema 5: Grefari de unitati antioxidante pe catene hidrofobe.

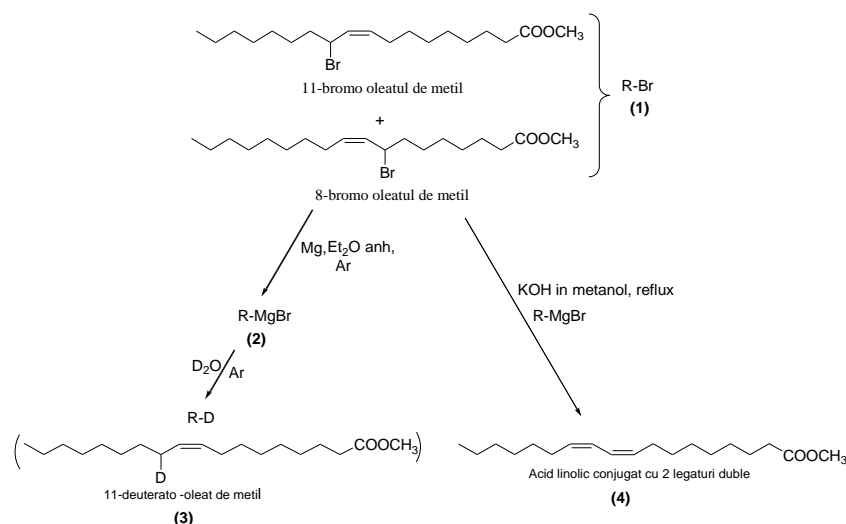
Pentru faza unica a proiectului care s-a desfășurat în anul 2009, s-au propus un număr de cinci obiective majore conform datelor prezentate în Planul de realizare al proiectului. Aceste obiective sunt:

1. Obiectiv propus și realizat: Funcționalizarea grasimilor nesaturate; utilizarea ca model a oleatului de metil

Îndeplinirea acestui obiectiv a început în anul 2008, iar pentru anul 2009 a mai fost programată o ultimă activitate:

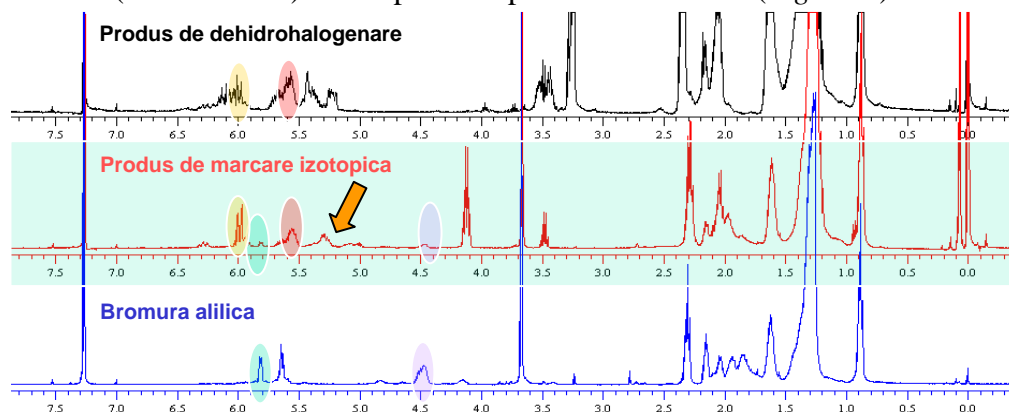
1.1. Obținerea de compuși marcați cu deuteriu în pozițiile 8, 11, 9 și 10 (eritro, treo) pentru studii biochimice și medicale

O cale de sinteză a compusilor chimici marcați izotopic o constituie strategia prin compuși organomagnezieni. O halogenură de alchil reacționează cu Mg, iar la decompunerea cu D₂O a intermediarului Grignard se obține un compus deuterat la atomul de carbon de care era legat halogenul. Astfel, pornind de la bromura alilică **1** (care a făcut obiectul cercetării în anul anterior – Obiectivul 4.1/2008) se obține pe această cale oleat de metil marcat izotopic în poziția 8 sau 11, conform Schemei 1.



Schema 1: Marcarea izotopică (prin deuterare în poziție alilică oleatului de metil).

Din analiza spectrului ¹H-RMN a rezultat că amestecul de reacție conține oleat de metil marcat izotopic și acizi linolici conjugati rezultați dintr-o reacție paralelă de dehidrohalogenare, identificați prin efectuarea reacției de dehidrohalogenare a bromurii alilice **1** în mediu bazic (KOH/MeOH) și compararea spectrelor ¹H-RMN (Figura 1).



Atribuțiile spectrale sunt prezentate în *Figura 2*.

Raportul integralelor per proton pentru cei trei compusi identificați în amestecul de reacție, corelat cu valoarea integralei protonilor grupei metil terminale, indică pentru amestecul de reacție al marcării izotopice următoarea compoziție:

- 22% compus marcat izotopic;
- 10% derivat bromurat alilic nereactionat;
- 27% acizi linolici conjugați
- 40% produși secundari neidentificați.

În cromatograma amestecului de reacție obținut la marcarea izotopică s-a obținut la timpul de retenție 24.71 min. un pic cromatografic al cărui spectru de masă indică o masă moleculară de 297 (corespunzătoare oleatului de metil deuterat).

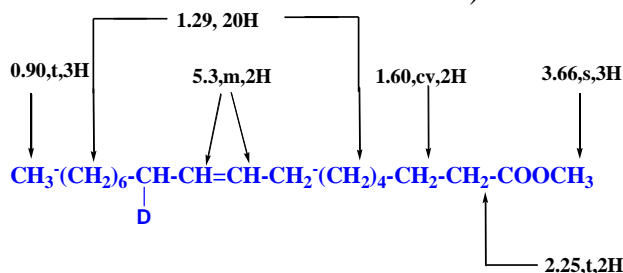


Figura 2: Atribuțiile spectrale ^1H -RMN(δ , ppm) pentru compusul deuterat (3)

2. Obiectiv propus și realizat: Analiza compozițională a vinurilor din banca de mostre creată prin obiectivul 1/2007, la 2 ani de învechire, prin spectrometrie ^1H -RMN

2.1. Înregistrarea spectrelor ^1H -RMN

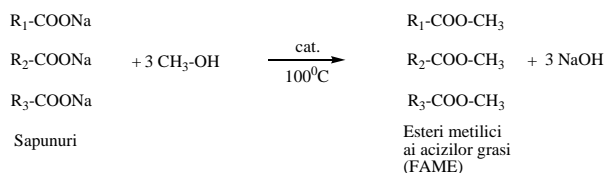
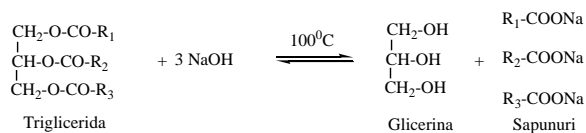
Au fost înregistrate spectrele RMN ale probelor aflate în banca de probe. Datele spectrale obținute vor fi utilizate în activitățile propuse pentru anul următor.

3. Obiectiv propus și realizat: Elaborarea procedurii de analiză compozițională a uleiurilor vegetale produse în România prin prelucrarea chemometrică originală a datelor furnizate de metoda CG-SM.

3.1. Transesterificarea trigliceridelor în esteri metilici ai acizilor componenți utilizând banca de mostre creată prin activitatea 2.1 din 2008

Analiza compozițională a acizilor grași din lipide se realizează de obicei prin gaz-cromatografie. Pentru aceasta, lipidele complexe trebuie transformate în esteri metilici ai acizilor grași (FAME) prin diverse metode de derivatizare. Aceștia, fiind mai volatili, pot fi analizați prin CG.

În cadrul prezentei lucrări s-a ales ca metodă de transesterificare varianta în cataliză acidă, folosind drept catalizator complexul $\text{BF}_3 \cdot \text{CH}_3\text{OH}$ (10-14% m/vol.), pentru a se realiza o metilare totală (trigliceride și eventuali acizi grași liberi, conform unui protocol de lucru din literatură [1]).



Schema 2: Transesterificarea trigliceridelor la esteri metilici în cataliză de $\text{BF}_3\text{-MeOH}$

3.2. Elaborarea metodei de calcul chemometric a indicilor tehnici și a metodei de autentificare a fiecărui tip de ulei

Inregistrarea cromatogramelor și analiza structurală și de compoziție a uleiurilor prin metoda GC-etalon

Probele de esteri metilici au fost supuse analizei cromatografice, folosindu-se două tehnici de identificare a esterilor metilici: metoda identificării prin compararea timpilor de retenție ai picurilor observate cu timpii de retenție ai cromatogramei unui amestec comercial standard de 37 esteri metilici ai acizilor grași (SupelcoTM 37 Component FAME Mix) – metoda CG-etalon – și metoda identificării esterilor metilici prin spectrele lor de masă – metoda CG-SM.

Metoda CG-etalon. Atât amestecul standard, cât și fiecare dintre amestecurile de esteri metilici rezultați prin transesterificarea probelor au fost separați cromatografic în aceleași condiții, pe o coloană capilară special proiectată pentru separarea esterilor metilici ai acizilor grași folosindu-se în toate cazurile același program de temperatură, în conformitate cu specificațiile producătorului amestecului standard, pentru o cât mai bună separare cromatografică. Calibrarea semnalelor s-a făcut ținând cont de concentrația fiecărui component din amestecul standard, calculându-se răspunsul detectorului pentru fiecare semnal în parte.

Esterii metilici ai acizilor grași din standard au fost cuantificați corectându-se, pentru fiecare pic cromatografic, integrala fiecărui pic cu factorul de răspuns al detectorului calculat pentru acidul gras corespunzător, ținându-se cont de concentrația fiecărui component din amestecul standard. Factorul de răspuns al detectorului a fost calculat raportându-se unitatea de arie a fiecărui semnal la unitatea de arie a semnalului acidului oleic (după ce în prealabil s-a realizat normalizarea concentrațiilor). Factorul de răspuns utilizat la calcularea compoziției a reprezentat media a cinci determinări; în *Tabelul 1* sunt prezentați timpii de retenție și factorii de răspuns pentru esterii metilici ai acizilor grași identificați în probele analizate.

Tabel 1: Esterii metilici ai acizilor grași identificați prin cromatografie de gaze

Nr. crt.	Ester metilic al acidului identificat	Timp de retenție (min)	Factor de răspuns
1.	Acid palmitic (C16:0)	23.3	0.912
2.	Acid stearic (C18:0)	26.5	1.005
3.	Acid oleic (C18:1)	27.6	1 (etalon)
4.	Acid linolic (C18:2)	29.1	0.983
5.	Acid arahidic (C20:0)	29.5	1.142
6.	Acid <i>cis</i> -11-eicosenoic (C20:1)	30.5	1.108
7.	Acid linolenic (C18:3)	30.8	0.943
8.	Acid behenic (C22:0)	32.4	1.232
9.	Acid erucic (C22:1)	33.4	1.175
10.	Acid heptadecanoic (C17:0)	24.9	0.852
11.	Acid <i>cis</i> -8,11,14-eicosatrienoic (C20:3)	33.1	1.055
12.	Acid lignoceric (24:0)	35.6	1.299
13.	Acid miristic (C14:0)	20.0	0.801
14.	Acid palmitoleic (C16:1)	24.5	0.890

Indicele de iod se poate calcula chemometric din datele cromatografice. Pentru a calcula indicele de iod, se va exprima compoziția pe acizi grași în procente masice (prin înmulțirea, pentru fiecare ester metilic în parte, a procentelor molare cu masa moleculară a esterului respectiv, însumarea valorilor obținute și exprimarea lor procentuală).

În continuare, se va calcula, pentru fiecare ester metilic, numărul de moli *per* 100g ulei (prin raportarea procentelor masice la masa moleculară a esterilor).

Indicele de iod se va calcula ținând cont de numărul de duble legături din catena hidrocarbonată a fiecărui ester metilic identificat.

Pentru o serie de amestecuri de uleiuri de diverse compoziții s-a determinat indicele de iod prin metoda GC-etalon. Acești indici calculați au fost comparați cu valorile indicilor determinați experimental prin metoda de standard [3]. Rezultatele comparative sunt centralizate în Tabelul 2.

Tabel 2: Indicele de iod (valorile calculate prin metoda GC și determinate experimental) pentru o serie de amestecuri de uleiuri vegetale de diferite compoziții

Nr. crt.	Proba	I_{iod} (metoda 1H -RMN) (A)	I_{iod} (metoda etalon) (B)	Abaterea (A)-(B)
1.	Proba 1	114.7	113.2	1.5
2.	Proba 2	187.9	185.2	2.7
3.	Proba 3	157.2	159.4	-2.2
4.	Proba 4	122.1	122.8	-0.7
5.	Proba 5	118.2	119.0	-0.8
6.	Proba 6	127.2	126.3	0.9
7.	Proba 7	118.1	119.4	-1.3
8.	Proba 8	125.1	124.2	0.9
9.	Proba 9	142.3	144.2	-1.9
10.	Proba 10	172.1	174.3	-2.2
11.	Proba 11	138.1	136.6	1.5
12.	Proba 12	171.0	168.7	2.3
13.	Proba 13	131.0	128.7	2.3

Pentru evaluarea metodei GC s-a calculat o abatere pătratică medie de 1.8, ceea ce semnifică o acuratețe a metodei de 1.3%. Astfel, metoda de calcul chemometric pe baza datelor 1H -RMN se dovedește eficientă pentru determinarea indicelui de iod al uleiurilor vegetale. Prin comparație cu metoda 1H -RMN, aceasta este mai precisă, însă este mult mai laborioasă, iar prin derivatizarea la esterii metilici proba originală se distruge.

Metoda CG-SM. O parte dintre probele de ulei au fost analizate din punct de vedere structural și funcțional prin metoda CG-SM. Cromatogramele au fost înregistrate cu ajutorul unui instrument Agilent HP 6890, cuplat cu detecție prin spectrometrie de masă. Separarea s-a făcut pe o coloană capilară model Agilent 19091s-433 (HP-5-MS), cu o lungime de 30.0 m,

diametru nominal 250.00um și grosime a filmului de 0.25um. Spre deosebire de metoda CG-etalon, unde s-a folosit o coloană capilară dedicată separării esterilor metilici ai acizilor grași (cu caracteristici speciale, precum lungimea de 100m), în cazul analizei CG-SM nu toți esterii metilici s-au separat corespunzător; astfel, acizii linolenic și linolic nu s-au separat, ei apărând în cromatogramă sub forma unui singur pic cromatografic. Identificarea esterilor metilici s-a făcut prin analiza spectrelor de masă ale acestora (picul molecular și fragmentările caracteristice) și compararea cu datele spectrale din baza de date a spectrometrului. În *Figura 3* se prezintă, spre exemplificare, cromatograma unei probe de ulei de soia.

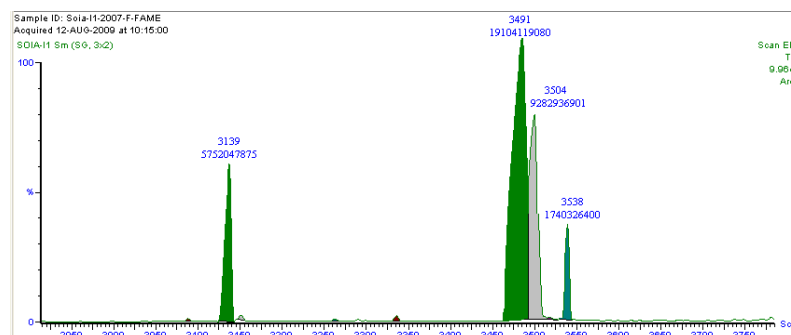


Figura 3: Cromatograma unei probe de ulei de soia.

În *Tabelul 3* se prezintă timpii de retenție și fragmentările caracteristice pentru principalii esteri metilici identificați în probele studiate.

Tabelul 3: Timpii de retenție și fragmentările caracteristice ale principalilor esteri metilici din probele studiate:

Nr. crt.	Timp de retenție Scan (min.)	Ester metilic al acidului	Fragmentări
1.	3139 (18.740 min.)	Palmitic	270.30 [M ⁺], 239.30 [M-31] ⁺ , 227, 74 (PB), 87, 101, 115, 129, 143, 157, 199
2.	3400 (20.304 min.)	Linolenic	292.30 [M ⁺], 261.20 [M-31] ⁺ , 236.20, 108.10, 79 (PB), 93
3.	3474 (20.744 min.)	Linolic	294.30 [M ⁺], 263.30 [M-31] ⁺ , 220.20 [M-74] ⁺ , 180.20 [M-116] ⁺ , 67, 81, 95, 109, 123
4.	3504 (20.982 min.)	Oleic	296.30 [M ⁺], 264.20 [M-32] ⁺ , 222.30 [M-74] ⁺ , 180.20 [M-116] ⁺ , 55 (PB)
5.	3538 (21.136 min.)	Stearic	298.30 [M ⁺], 267.31 [M-31] ⁺ , 267.31 [M-43] ⁺ , 74 (PB), 87, 101, 115, 129, 143, 157, 199

În *Tabelul 4* se prezintă compoziția unor probe de ulei determinată prin metodele cromatografice menționate mai sus.

Tabelul 4: Compoziția uleiurilor

Nr. crt.	Proba	Tipul uleiului	Esteri metilici identificați și cuantificați cromatografic (% molare)						
			Palmitic	Linolenic+ Linolic	Oleic	Stearic	Erucic	cis-11- eicosenoic	Arachidic
1.	FS-1	floarea-soarelui	7.40	62.80	25.09	4.71	0	0	0
2.	S-1	soia	16.03	53.24	25.87	4.85	0	0	0
3.	R-1*	rașiță	4.12	23.36	25.09	0	32.25	15.19	0
4.	In-1	in	6.61	72.78	15.92	4.69	0	0	0
5.	R-2	rașiță	6.58	22.86	67.53	3.03	0	0	0
6.	In-2	in	4.32	62.29	27.04	6.35	0	0	0
7.	R-3	rașiță	4.71	27.53	65.21	2.55	0	0	0
8.	S-2	soia	11.71	61.49	22.17	4.63	0	0	0
9.	FS-2	floarea-soarelui	5.32	55.13	34.51	5.04	0	0	0
10.	R-4*	rașiță	5.95	25.23	65.25	1.86	0	1.12	0.59
11.	FS-3*	floarea-soarelui	7.52	66.80	23.42	2.26	0	0	0
12.	FS-4*	floarea-soarelui	8.55	61.60	26.44	3.41	0	0	0
13.	In-3*	in	6.97	73.24	15.24	4.55	0	0	0
14.	In-4*	in	4.98	65.74	24.72	4.56	0	0	0
15.	S-3*	soia	12.65	62.54	20.39	4.42	0	0	0
16.	S-4*	soia	12.74	63.75	18.80	4.71	0	0	0
17.	S-5*	soia	13.51	62.94	19.30	4.25	0	0	0
18.	R-5*	rașiță	5.25	26.65	63.41	2.55	1.15	0.74	0.25

* Analizați prin metoda GC-etalon

Rezultatele din *Tabelul 4* constituie datele primare pentru analiza statistică cu scopul autentificării tipului de ulei (floarea-soarelui, soia, in și rapiță). Probele sunt caracterizate prin compoziția lor pe cele 7 clase de acizi grași din *Tabelul 4* care reprezintă, în contextul analizei statistice, 7 variabile ale reprezentării vectoriale a fiecărei probe de ulei. Probele au fost împărțite în două loturi: de calibrare a modelului (16) și de testare a acestuia (S-5 și R-5). Pentru calibrarea modelului de autentificare a tipului de ulei s-a folosit o metodă de clasificare, *Analiza Componentelor Principali (PCA)*. Aceasta este o tehnică de analiză a variabilelor unui sistem în funcție de gradul în care acestea contribuie la descrierea variației aceluși sistem [2]. Astfel, prin tehnica PCA se selectează un număr redus de variabile (numite *Componente Principali*) care descriu în cea mai mare proporție variabilitatea sistemului original de date. Aceste operații au fost efectuate folosind pachetul software *Unscramble 9.1* de analiză statistică.

În *Figura 4* se prezintă reprezentarea scorurilor PC3/PC1 pentru lotul de calibrare.

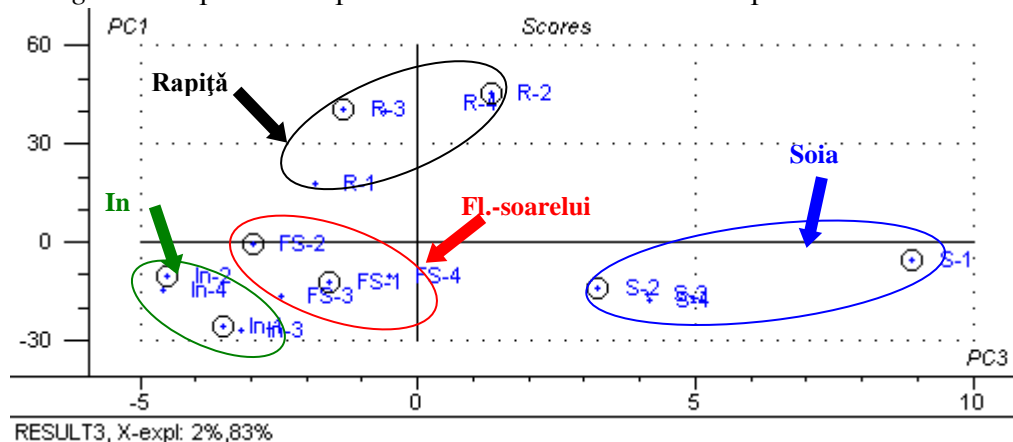


Figura xxx: Reprezentarea scorurilor PC3/PC1 pentru lotul de calibrare.

Figura 4: Reprezentarea PC3/PC1

Se poate observa o grupare satisfăcătoare a probelor în funcție de tipul de ulei. Pentru testarea modelului, se analizează în același fel și probele din lotul de testare, urmărindu-se zona în care acestea vor fi reprezentate pe “harta” PC3/PC1 (*Figura 5*).

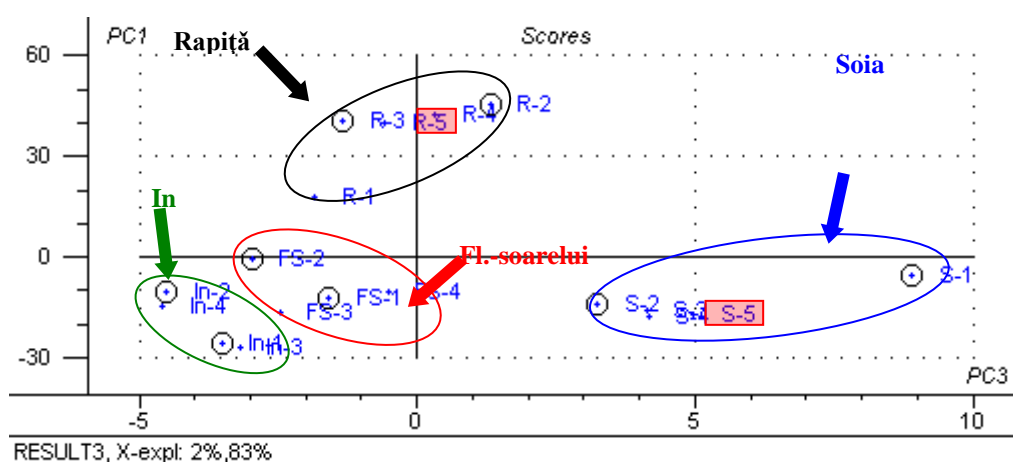


Figura 5: Plasarea probelor din lotul de testare în reprezentarea PC3/PC1

Din *Figura 5* se observă că probele din lotul de testare se plasează corespunzător, respectiv în zona uleiurilor de soia (proba S-5) și în zona uleiurilor de rapiță (proba R-5).

4. Obiectiv propus și realizat: Elaborarea procedurii de autentificare a vinurilor de diferite soiuri, podgorii (și, eventual, recolte) prin prelucrarea chemometrică originală a datelor furnizate de metoda CG-SM.

2.1. Stabilirea metodei de extracție continuă optimă (solvent, timp de extracție, reproductibilitate)

Analiza CG-MS a vinurilor nu poate fi efectuată direct, așa cum se întâmplă în cazul analizei RMN, fiind necesară o metodă de extracție în prealabil. În cadrul acestei activități am urmărit stabilirea metodei optime de extracție continuă a vinului.

S-a urmărit întâi stabilirea unui solvent potrivit pentru extracție care să fie cât mai accesibil și care să poată extrage un număr cât mai mare de compuși organici. Au fost aleși eterul etilic și clorura de metilen. În urma extracției continue cu eter etilic s-a observat o abundență mai mare a compușilor extrasi. Acest lucru a putut fi observat atât prin numărul picurilor din cromatogramă cât și prin analiza ^1H -RMN a extractelor. S-a observat însă că în urma extracției continue cu eter etilic în spectrul RMN al extractului se observă apariția unei cantități mai mari de acetaldehidă. Aldehida acetică s-a format cel mai probabil în timpul extracției în timpul extracției, deoarece semnalele ei nu sunt vizibile în spectrul RMN al probei de vin și nici în spectrul RMN al extractului obținut în urma extracției cu CH_2Cl_2 . Prin urmare s-a stabilit că solventul utilizat în extracții să fie clorura de metilen (figura 1).

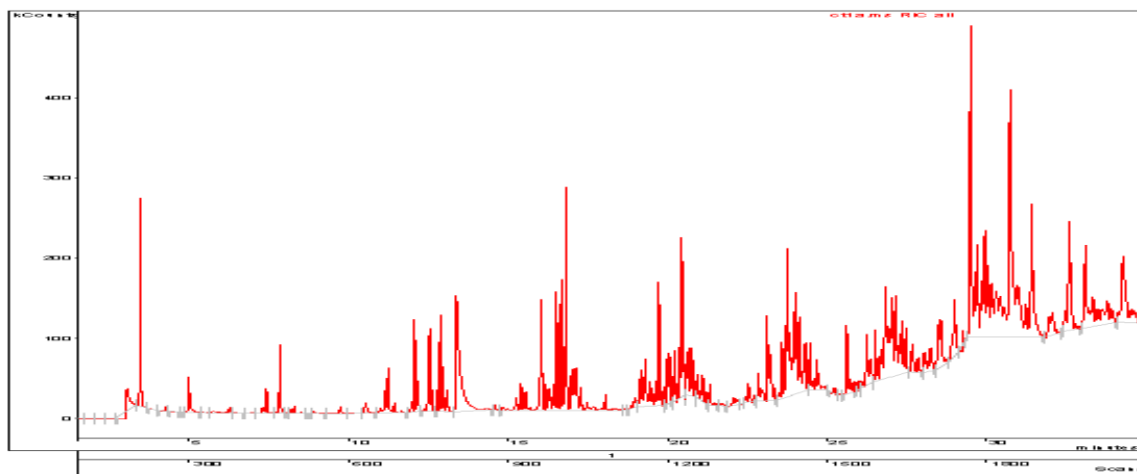


Figura 1. Cromatogramă unui concentrat de vin Feteasca Neagra, obținut prin extracție cu clorura de metilen

Pentru stabilirea timpului optim de extracție s-au analizat prin CG-SM probe de vin care au fost supuse extracției continue lichid-lichid 1h, 2h,... 10h. În urma identificării compușilor din cromatogramă pe baza spectrului de masă obținut, aceștia au putut fi dozați în diferitele probe. S-a observat că după aproximativ 3-4 ore se produce o stabilizare a cantității extrase pentru majoritatea compușilor extractibili în clorura de metilen. Astfel se poate considera că după 4 ore de extracție continuă lichid-lichid s-a atins optimul de extracție.

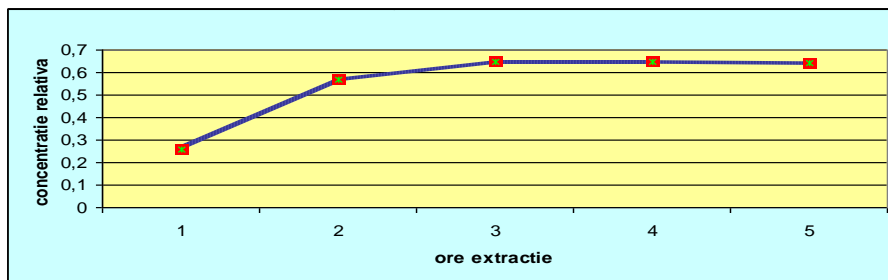


Figura 2. Extracție lichid-lichid pentru o proba de Merlot 2007, produsă de Valea Călugărească, variația de 2,3 butan-diol extras în clorura de metilen

Problemele de reproductibilitate ridicate de aceasta procedura sunt destul de importante datorita numeroaselor etape de prelucrare pe care le sufera proba inainte de analiza CG-SM propriuzisa. S-a observat ca analiza extractelor prin CG-SM trebuie facuta imediat dupa extractie deoarece in timp se produc modificari substantiale ale probei.

References

1. M.C. Todasca, N. Chira, C. Deleanu, S. Rosca, Romanian Wine Study Using IR Spectroscopy in Comparison with $^1\text{H-NMR}$, Scientific Bulletin, Series B, UPB, 2007, 69 (4), 3-10.
2. M.C. Todasca, M. Avramescu, N. Chira, C. Deleanu, S. Rosca, "Study of compositional changes in must during fermentation process using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy", Revista de Chimie, 2008, 59 (10), 1101-1105.
3. R. Stan, N. Chira, C. Ott, C. Todasca, E. Perez, "Catanionic Organogelators Derived from D-Sorbitol and Natural Fatty Acids", Revista de Chimie, 2009, 59 (3), 273-276.
4. N.A. Chira, M.C. Todasca, A. Nicolescu, A. Roșu, M. Nicolae, S. Rosca, "Evaluation of the Computational Methods for Determining Vegetable Oils Composition using $^1\text{H-NMR}$ Spectroscopy", Revista de Chimie, 2009, in press.
5. N.A. Chira, M.C. Todasca, G. Păunescu, I. David, N. Ionescu, M. Stanciu, S. Rosca, " Romanian Vegetable Oils Authentication By Multivariate Analysis of $^1\text{H-NMR}$ Data", Revista de Chimie, 2009, in press.
6. Nicoleta Chira, Cristina Todașcă, Take Constantinescu, Sorin Roșca, Azo-Dye Grafted Polymers from Epoxidized Linseed Oil, Revista de Materiale Plastice, 2010, trimis spre publicare.
7. Maria-Cristina Todasca, Laura Fotescu, Fulvia Hincu, Nicoleta Chira, Sorin Rosca, Comparative Study of Wines Obtained Trough Different Technological Methods Using IR Spectroscopy, Revista de Chimie, 2010, trimis spre publicare.
8. Maria-Cristina Todasca, Laura Fotescu, Nicoleta Chira, Calin Deleanu, Sorin Rosca, Composition Changes in Wines Produced by Different Growing Techniques Examined Trough $^1\text{H-NMR}$ Spectroscopy, Revista de Chimie, 2010, trimis spre publicare.
9. Nicoleta CHIRA, Cristina TODAȘCĂ, Alina NICOLESCU, Gabriela PĂUNESCU, Sorin ROȘCA, Determination of the Technical Quality Indices of Vegetable Oils by Modern Physical Techniques, Buletinul Științific al UPB, 2010, trimis spre publicare.