



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2011 01333**

(22) Data de depozit: **07/12/2011**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/12/2016** BOPI nr. **12/2016**

(41) Data publicării cererii:
30/07/2013 BOPI nr. **7/2013**

(73) Titular:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
TEHNOLOGII CRIOGENICE ȘI IZOTOPICE**
- **ICSI RÂMNICU VÂLCEA, STR.UZINEI**
NR.4, OP RÂURENI, CP.7,
RÂMNICU VÂLCEA, VL, RO

(72) Inventatori:
• **IONETE ROXANA ELENA,**
STR. LUCEAFĂRULUI NR. 6, BL. A2, SC. A,
AP. 18, RÂMNICU-VÂLCEA, VL, RO;
• **POPESCU RALUCA, STR. BUDA NR. 10B,**
RÂMNICU VÂLCEA, VL, RO;
• **COSTINEL DIANA, STR. REPUBLICII**
NR. 32, BL. R36, SC. A, AP. 1,
RÂMNICU VÂLCEA, VL, RO;
• **ȘTEFĂNESCU IOAN,**
BD.NICOLAE BĂLCESCU NR.4,
RÂMNICU VÂLCEA, VL, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**Y. KOTSERIDIS ȘI COL., "QUANTITATIVE
DETERMINATION OF BETA-IONONE IN
RED WINES AND GRAPES OF BORDEAUX
USING A STABLE ISOTOPE DILUTION
ASSAY", JOURNAL OF
CHROMATOGRAPHY A, VOL. 848, PP.
317-325, 1999; FR 2673291 A1; A.**
**CABANERO ȘI COL., "ISOTOP RATIOS
MASS SPECTROMETRY COUPLED TO
LIQUID AND GAS CHROMOTOGRAPHY
FOR WINE ETHANOL
CHARACTERIZATION", RAPID
COMMUNICATIONS IN MASS
SPECTROMETRY, VOL. 20, PP. 3111-3118,
2008; J. A. J. DUNGAIT ȘI COL.,
"VARIATION IN BULK TISSUE, FATTY
ACID AND MONOSACCHARIDE DELTA ¹³
C VALUES BETWEEN AUTOTROPHIC
AND HETEROTROPHIC PLANT ORGANS",
PHYTOCHEMISTRY, VOL. 72, PP.
2130-2138, 2011; US 2010/0101304 A1**

(54) **PROCEDEU DE AMPRENTARE IZOTOPICĂ A COMPUȘILOR
DE AROMĂ DIN PROBE LICHIDE, ÎN SPECIAL VIN**



1 Invenția se referă la un procedeu de amprentare izotopică a compușilor de aromă din
probe lichide, în special vin.

3 La nivel mondial, în ultima perioadă de timp se fac eforturi intense pentru dezvoltarea
de metode analitice performante, cu aplicație în autentificarea alimentelor, politica în
5 domeniul calității fiind orientată în special spre dezvoltarea de sisteme de protejare a consu-
matorilor, prin asigurarea unei calități reale a materiilor prime utilizate pentru obținerea pro-
7 duselor alimentare, încurajând totodată protecția împotriva imitațiilor și folosirii eronate a
denumirii unor produse renumite, cunoscute ca atare publicului larg consumator. Consuma-
9 torii sunt sprijiniți prin furnizarea de informații referitoare la caracteristicile și compoziția
produselor, după caz.

11 Prezenta invenție vine în sprijinul acestui deziderat, rezolvând problema amprentării
izotopice complete, globală și specifică pe compus, a aromelor dintr-un lichid, în special vin.
13 Principiul acesteia se bazează pe faptul că raportul natural al izotopilor stabili în materiile
organice vegetale nu este constant, ci depinde de conținutul izotopic original al moleculelor
15 folosite de plantă pentru fotosinteză (apă și bioxid de carbon), și de fracționarea izotopică
ce are loc de-a lungul căilor biosintetice. Ambele molecule precursor sunt caracterizate de
17 rapoarte izotopice specifice. Izotopii stabili sunt atomi ai aceluiași element, cu o masă ato-
mică diferită cu câteva unități de masă, ca urmare a numărului diferit de neutroni în nucleu,
19 și care nu se degradează prin procese radioactive în timp. Pentru stabilirea autenticității unui
produs, luându-se în considerare izotopii stabili (de exemplu, ^{18}O , ^2H , ^{13}C , ^{15}N etc.), deter-
21 minarea rapoartelor izotopice (raportul dintre izotopul greu și cel ușor al aceluiași element -
de exemplu, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ etc.) este în mod cert mult mai utilă decât alte
23 investigații analitice ca, de exemplu, compoziția în microelemente, deoarece C și H sunt
constituenți ai tuturor compușilor organici din probe lichide, în special vin, iar O și N sunt și
25 ele larg reprezentate (oxigenul de la apă la zaharuri, alcooli, acizi, săruri, arome, polifenoli
etc., iar azotul la peptide, aminoacizi, proteine etc.).

27 În natură, majoritatea bioelementelor reprezintă amestecuri de doi sau mai mulți
izotopi stabili. S-a observat că, din punct de vedere al conținutului izotopic, variația compo-
29 ziției moleculelor depinde de originea acestora. Variabilitatea este legată de conținutul
izotopic al sursei și de fracționarea izotopică asociată cu procesele fizice, etapele chimice
31 și/sau căile biochimice implicate în timpul formării moleculei. De exemplu, în ciclul apei, în
timpul evaporării apei din oceane, are loc fenomenul de fracționare izotopică - sărăcirea în
33 izotopul mai greu este observată în starea de vapori în raport cu cea lichidă. O fracționare
izotopică similară are loc în timpul procesului de evapo-transpirație al apei din plante,
35 observându-se rapoarte izotopice mai mari în apa din plante, comparativ cu cea din sursa
de alimentare (de exemplu, ape subterane, precipitații).

37 Subliniem faptul că produsele obținute prin sinteză chimică au un conținut izotopic
dependent de cel al materiei prime utilizate, și de efectele termodinamice și cinetice ale
39 fracționării izotopice care au loc în timpul sintezei.

Utilizarea complementară a unor tehnici analitice precum cromatografia de gaze și
41 spectrometria de masă, pentru rapoarte izotopice, a căpătat amploare în diverse aplicații ale
științelor vieții (W. Meier-Augenstein, „Applied gas chromatography coupled to isotope
43 ratio mass spectrometry", *Journal of Chromatography A*, 842, 1999, p. 351-371), literatura
de specialitate evidențiind o diversitate de aspecte referitoare la analiza izotopică pe compus
45 specific realizată pe materiale organice (P. A. Eakin și colab., „Some instrumental effects
in the determination of stable carbon isotope ratios by gas chromatography - isotope
47 ratio mass spectrometry", *Chemical Geology. Isotope Geoscience section* 101, 1992,
pp. 71-79), dar și de optimizare a metodelor (K. Grob, *Making and manipulating capillary*

columns for gas chromatography, Dr. Alfred Huthig Verlag, Heidelberg, Germany, 1986; D. A. Merritt și colab., „Performance and optimization of a combustion interface for isotope ratio monitoring gas chromatography/mass spectrometry”, *Analytical Chemistry* 67, 1995, pp. 2461-2473). Specific investigațiilor legate de evaluarea compozițională a probelor lichide, în particular vin, au fost evidențiate de-a lungul timpului diverse metode (US 005200909 A; US 006978243 B2) și echipamente de caracterizare compozițională (US 20070104832 A1), în scopul clasificării și autentificării acestora.

Datorită capacității sale de a măsura cu acuratețe și mare precizie distribuția izotopilor la nivel natural în probe lichide, GC-C-IRMS (Gas Chromatography - Combustion-Isotope Ratio Mass Spectrometry) devine din ce în ce mai mult o metodă de luat în considerare pentru controlul autenticității produselor alimentare. În combinație cu compuși marcați cu izotopi stabili (de exemplu, ^{13}C), cuplajul GC-IRMS a fost utilizat pentru caracterizarea alcoolului etilic din probe de vin (FR 2673291 A1), cât și a unor compuși organici majoritari regăsiți în vin (A. I. Cabanero și colab., „Isotope ratio mass spectrometry coupled to liquid and gas chromatography for wine ethanol characterization”, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22, 2008, pp. 3111-3118). Totodată, se realizează concentrarea compușilor țintă din probe de vin, în scopul optimizării investigațiilor prin cromatografie (Y. Kotseridis și colab., „Quantitative determination of β -ionone in red wines and grapes of Bordeaux using a stable isotope dilution assay”, *Journal of Chromatography A* 848, 1999, pp. 317-325), o modalitate fiind prin utilizarea unei serii de extracții lichid-lichid cu solvent organic, urmată de reunirea și concentrarea fazelor organice.

Datorită informațiilor fiabile furnizate de izotopii stabili pentru clasificarea sau certificarea autenticității probelor organice, odată cu extinderea ariei de aplicații a cuplajului GC-C-IRMS (J. A. J. Dungait, „Variation in bulk tissue, fatty acid and monosaccharide $\delta^{13}\text{C}$ values between autotrophic and heterotrophic plant organs”, *Phytochemistry* 72, 2011, pp. 2130-2138) s-au optimizat și sistemele de măsurare (US 20100101304 A1).

Plecând de la stadiul tehnicii și al cercetărilor existente, problema tehnică pe care această invenție o rezolvă este legată de obținerea unei amprente globale și specifice a compușilor de aromă din probe lichide, în special vin, prin spectrometrie de masă izotopică, cuplată cu cromatografie de gaze.

Procedeul de amprentare izotopică a compușilor de aromă din probe lichide, produse lichide de origine naturală, în special vin, conform invenției, cuprinde următoarele etape:

(a) prepararea unei probe reprezentate de un extract organic al probei lichide ce se dorește a fi analizată, prin extracție lichid-lichid într-un solvent organic, și concentrarea compușilor de aromă,

(b) identificarea compușilor de aromă țintă din extractul organic obținut la etapa (a), prin cromatografie de gaze cuplată cu spectrometrie de masă (GC-MS),

(c) amprentare izotopică globală, prin combustie pe un analizor elemental (EA-IRMS) a solventilor organici utilizați în etapa (a) și a compușilor de aromă puri, utilizați ca materiale de referință pentru analiza prin GC-MS de la etapa (b) și GC-C-IRMS de la (d), și

(d) amprentare izotopică specifică a compușilor de aromă din extractul organic obținut în etapa (a) prin (GC-C-IRMS), în scopul amprentării izotopice a compușilor de aromă care definesc tipicitatea soiului, respectiv, a celor minoritari, în vederea determinării originii probelor lichide.

Prezenta invenție vine să sprijine activitățile de certificare a autenticității unui produs, rezolvând problema amprentării izotopice complete, global și specific pe compus, a aromelor dintr-un lichid, în special vin.

1 Evaluarea compoziției naturale în izotopi stabili a unei probe lichide, în particular, vin,
constituie una dintre aplicațiile cele mai performante ale chimiei analitice, prin care putem
3 stabili relații de legătură între produsul finit (de exemplu, vin) și materiile prime (de exemplu,
apa, planta) din mediul lor natural.

5 Utilizând acest procedeu de amprentare izotopică, se poate oferi o evaluare ușor de
înțeles, cantitativă a caracteristicilor unui lichid, de exemplu, vinul, în care sunt evaluați
7 compușii de aromă specifici ai lichidului.

Se prezintă în continuare o scurtă descriere a figurilor:

9 - fig. 1, modelul conceptual de amprentare izotopică specifică pe compus pentru o
probă lichidă, în special vin;

11 - fig. 2, matrice conținând un amestec indus de 4 compuși organici volatili (arome):
1-hexanol, etil octanoat, etil decanoat și dietil succinat (coloana TG-WAXMS 30 m x 0,25 mm x
13 0,25 μm, modul de injectare splitless, curgere splitare 50 ml/min, eluent Heliu 1 bar, gaz de
referință CO₂ 1,1 bar, temperatură start 40°C, izotermă 3 min, rată încălzire 70°C/min până
15 la 220°C);

- fig. 3, matrice reală de vin (coloana TG-WAXMS 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm, modul
17 de injectare splitless, curgere splitare 50 ml/min, eluent Heliu 1 bar, gaz referință CO₂ 1,1 bar,
temperatură start 40°C, izotermă 3 min, rată încălzire 70°C/min până la 220°C).

19 Prezenta invenție descrie un procedeu de amprentare izotopică a compușilor de aromă
din probe lichide, în special vin, bazat pe o succesiune de etape, conform fig. 1, plecând de
21 la prepararea probei prin extracția compușilor țintă (pasul I), identificarea lor preliminar
calitativă (pasul II), determinarea timpilor de retenție și stabilirea parametrilor de lucru pentru
23 amprentarea izotopică specifică pe compus (pasul III), și terminând cu amprentarea lor
izotopică globală (pasul IV) și specifică (pasul V).

25 Un prim pas esențial în amprentarea izotopică a compușilor de aromă constă în
extracția compușilor țintă din matricea probei, astfel încât solvenții utilizați să interfereze cât
27 mai puțin cu proba și să poată fi eliminați cât mai ușor în pasul final.

Prepararea probei (pasul I) presupune separarea compușilor volatili din proba lichidă,
29 în special vin, prin extracție lichid-lichid, cu utilizarea unor solvenți organici, de exemplu,
pentan, hexan, eter de petrol și în special diclorometan. Se realizează un număr de extracții,
31 minimum trei, cu o durată individuală cuprinsă în intervalul 10...60 min, având rapoartele
volumetrice probă:solvent într-o plajă de valori de 5:1...25:1. Extractele organice se reunesc
33 și se usucă apoi cu un agent desicant (de exemplu, sulfat de sodiu sau silicagel). Extractul
organic uscat se concentrează la un volum final de 50...2000 μl, acesta constituind proba
35 pentru determinările prin cromatografie de gaze. Avantajele aduse de această metodă constau
în reducerea timpului de extracție, utilizarea unor solvenți indigeni, o mai bună reproducibil-
37 bilitate, simplitate și rapiditate, și costuri scăzute, nefiind necesare echipamente de laborator
s sofisticate, și nici personal tehnic având o pregătire specială.

39 Din extractul astfel obținut se identifică astfel compușii de aromă (pasul II), prin
utilizarea cromatografiei de gaze cuplată cu spectrometrie de masă. Parametrii de funcționare
41 ai cromatografului de gaze utilizați pentru acest tip de determinare sunt: diluarea probei
injectate: fără diluare - diluare 50:1, în special diluare de 10:1; tip coloana cromatografică:
43 coloană capilară cu fază staționară de polaritate medie sau mare, în special din polietilenglicol;
volumul de probă injectat între 0,1...10 μl, în special 1 μl; temperatură injector în intervalul
45 150...250°C, în special 190...200°C; temperatura inițială a cuptorului cromatografic între 5°C
peste temperatura ambiantă și 50°C; temperatura finală a cuptorului cromatografic de
47 70...250°C, în special 150...200°C; viteza de creștere a temperaturii cuptorului cromatografic

de 1...30°C/min, în special 3...5°C/min. Parametrii de funcționare setați pentru spectrometrul de masă sunt: mod de ionizare - impact electronic cu citirea întregului spectru de masă, și domeniu de citire a maselor în intervalul 10...400 m/z, în special 30...150 m/z.	1
Compușii de aromă se vor identifica prin:	3
a) compararea spectrelor de masă ale acestora cu o bancă de spectre de masă existentă în memoria internă a instrumentului de analiză,	5
b) compararea spectrelor de masă ale compușilor de aromă cu cele ale compușilor de referință, și prin	7
c) compararea timpilor de retenție pe coloana cromatografică a analiților cu timpii de retenție ai compușilor de referință. Compușii de aromă identificați prin această tehnică vor fi considerați compuși țintă în analiza prin cromatografie de gaze cuplată cu spectrometrie de masă a rapoartelor izotopice (GC-C-IRMS) - pasul V.	9
Determinarea timpilor de retenție și stabilirea parametrilor de lucru pentru amprentarea izotopică specifică pe compus a aromelor/compușilor organici volatili din probe lichide, în special vin, este caracterizată prin aceea că include două etape: determinarea timpilor de retenție ai solvenților implicați în prepararea probei, ai materialelor de referință certificate, amprentate izotopic global în pasul IV, și stabilirea parametrilor de lucru pentru cromatograful de gaze, pentru cuptoarele de oxidare/reducere, reglarea debitelor gazelor de referință etc. Identificarea compușilor țintă în pasul II a permis alegerea unei coloane capilare cu fază staționară cu polaritatea constituenților probei (polară, de exemplu, TG-WAXMS) și a materialelor de referință specifice acestora. Tipul de injectare folosit este de tip splitless, iar pentru evitarea lărgirii plicului, splitul este deschis 10 s după injectare, curgere splitare 50 ml/min. Gradientii de temperatură au fost aleși pentru a exploata la maximum lungimea coloanei: cu cât este mai mare lungimea coloanei, cu atât crește mai lent temperatura pe minut (de exemplu, minimum 3°C/min). Presiunea din coloană și viteza eluentului (de exemplu, Helium, puritate 99,9999%) sunt setate pentru a se potrivi diametrului coloanei capilare (minimum 1 bar). Pentru a ajuta la focalizarea probei injectate și la obținerea unor picuri mai ascuțite, se utilizează un decalaj de reținere cunoscut drept precoloană sau coloană de gardă, o bucată dezactivată dintr-un capilar din siliciu, de minimum 1 m lungime. Conversia probei în gaze simple necesită utilizarea unei interfețe de combustie între cromatograful de gaze și spectrometrul de masă, unde efluentul (Helium în calitate de gaz purtător și probă) este alimentat într-un reactor de combustie (de oxidare). Acest reactor este un tub ceramic umplut cu CuO/NiO/Pt și menținut la o temperatură de aproximativ 960°C. Pentru a elimina vaporii de apă generați în timpul combustiei, efluentul trece printr-o trapă din nafion. Nafionul este un polimer fluorurat ce reacționează ca o membrană semipermanentă, prin care apa este reținută, în timp ce toți ceilalți produși de combustie sunt reținuți în fluxul de gaz purtător (Helium). Îndepărtarea cantitativă a apei înaintea introducerii gazelor de combustie în sursa de ioni este esențială, deoarece orice reziduu de apă ar duce la "protonarea" gazului CO ₂ , producând HCO ₂ ⁺ , care interferează cu analizele de CO ₂ (interferență izobară). Pentru fiecare secvență de analiză a unei probe trebuie verificat ca deviația standard a trei măsurători succesive ale aceleiași probe să fie mai mică de 0,6‰. Rezultatul final pentru probă este dat de valoarea medie pentru trei măsurători. Dacă deviația este mai mare de 0,6‰, măsurătoarea trebuie repetată. Valoarea ¹³ C a standardului de lucru nu trebuie să difere cu mai mult de 0,5‰ față de valoarea admisă (certificată). În caz contrar, trebuie verificate setările spectrometrului și, dacă este necesar, ajustate.	13
Anterior amprentării izotopice specifice a compușilor de aromă din probă, se realizează o evaluare a rapoartelor izotopice globale (pasul IV) atât pentru solvenții ce intervin la prepararea și extracția compușilor țintă din matricea probei, cât și pe compușii de	15
	17
	19
	21
	23
	25
	27
	29
	31
	33
	35
	37
	39
	41
	43
	45
	47

aromă/compușii organici volatili puri, nediluati, utilizați ca materiale de referință, compuși care sunt folosiți ulterior în etapa de determinare a timpilor de retenție pe coloana capilară, și stabilire a parametrilor de lucru pentru amprentarea izotopică specifică pe compus. Cunoscând timpii de retenție ai compușilor de interes mai sus menționați, pentru a obține o cromatogramă doar cu picurile acestor compuși și a elimina solvenții utilizați în etapa de preparare, se introduce diluție cu heliu (100:1) pentru intervalele de timp aflate în afara domeniului de interes $t_i \pm 100$ s ($i = \overline{1, n}$ unde n = număr de compuși țintă).

Materialele de referință folosite sunt reprezentate de compuși chimici de puritate pentru cromatografia de gaze sau echivalentă, fiind împărțite în următoarele categorii:

- compuși de aromă puri, care pot include alcooli, acizi, esteri, terpene, compuși carbonilici etc. care se pot regăsi în probele lichide, în special vin;

- solvenți organici, care sunt reprezentați de solvenții de extracție, și solvenți în care se dizolvă compușii de aromă, de exemplu, etanol, metanol, acetonă, eter etilic; în special etanol;

- soluții de compuși de aromă în solvenți organici. Solubilitatea compusului de aromă în solventul organic selecționat trebuie să fie cât mai mare. Se prepară soluții în domeniul de concentrații de $\pm 20\%$ față de valorile concentrației compusului de aromă din proba lichidă, în special vin.

Pentru amprentarea izotopică specifică pe compus, același extract obținut în pasul I și investigat în pasul II este introdus în sistemul de separare al unui cromatograf GC-C/TC (Gas Chromatograph - Combustion/Total Combustion), cuplat la un spectrometru de masă IRMS. Cromatograful de gaze permite, într-o primă fază, separarea compușilor din extract pe coloana cromatografică, și apoi identificarea timpilor de reținere pe coloană, pentru picurile compușilor de interes apăruiți pe cromatogramă, crearea unei metode de lucru prin care să se efectueze diluție cu heliu (100:1) pentru intervalele de timp aflate în afara domeniului $t_i \pm 100$ s ($i = \overline{1, n}$ unde n = număr de compuși țintă), astfel încât prin cuptorul

de combustie sau piroliză să treacă doar compușii de interes, restul fiind eliminați de pompa de vid preliminar. În metoda creată, intervalul de timp în care se face introducerea automată a probelor în cromatograful de gaze ține cont ca picurile gazului de referință (de exemplu, CO_2 , H_2 sau N_2) cu valoare cunoscută a raportului izotopic, determinată cu ajutorul etaloanelor de referință corespunzătoare, și care apar în prima parte a secvenței de lucru, să nu se suprapună atât cu picurile solvenților, cât și cu cele ale compușilor țintă. Măsurătorile prin spectrometrie de masă izotopică sunt derulate prin analiza compușilor gazoși (de exemplu, H_2 , CO_2 sau N_2) obținuți prin combustia sau piroliza probei, pentru determinarea conținutului în izotopi stabili ai elementelor componente (de exemplu, hidrogen, carbon, oxigen sau azot).

Intensitățile curenților ionici m/z corespunzătoare izotopomerilor elementelor analizate sunt măsurate prin spectrometrie de masă atât pentru probă, cât și pentru standardul utilizat. Valoarea măsurată este diferența dintre raportul izotopic al probei (R_x) și raportul izotopic al unui compus de referință (R_{std}) exprimată prin mărimea δ (‰), definită ca:

$$\delta X = \frac{R_x - R_{std}}{R_{std}} \times 1000$$

unde $X = {}^2\text{H}$, ${}^{13}\text{C}$, ${}^{15}\text{N}$, respectiv, ${}^{18}\text{O}$, iar $R = {}^2\text{H}/{}^1\text{H}$, ${}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}$, ${}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N}$, respectiv, ${}^{18}\text{O}/{}^{16}\text{O}$. Toate valorile rapoartelor izotopice obținute vor alcătui o amprentă izotopică specifică fiecărui compus, contribuind la alcătuirea unui profil aromatic tipic unei probe lichide, în special a unui vin autentic.

În fig. 2 și 3 sunt prezentate rezultate experimentale privind amprentarea specifică a compușilor de aromă identificați într-o probă de vin. Exemplificarea pentru o probă de vin este următoarea:	1
(a) inițial, un amestec de 4 compuși organici volatili (1-Hexanol:octanoat de etil:decanoat de etil:dietilsuccinat) este injectat în GC-C-IRMS, obținându-se pentru fiecare compus timpul de reținere: $t_1 = 755$ s (1-Hexanol), $t_2 = 845$ s (octanoat de etil), $t_3 = 1051$ s (decanoat de etil) și $t_4 = 1088$ s (dietilsuccinat);	3
(b) ulterior, se introduce matricea reală, în acest caz proba de vin (fig. 3), și se evaluează valorile rapoartelor izotopice obținute pentru picurile apărute la timpii de reținere identificați anterior (± 3 s). Pentru această cromatogramă, diluțiile cu heliu (100:1) se fac pe intervalul: 250÷640 s și 1170÷1400 s. Conform metodei create, în primele 200 s apar picurile gazului de referință (de exemplu, CO_2) a cărei valoare a raportului izotopic este cunoscută, fiind determinată cu ajutorul etaloanelor de referință corespunzătoare. Valorile rapoartelor izotopice obținute pentru compușii de aromă țintă ai fiecărei probe de vin constituie o amprentă izotopică specifică produsului respectiv.	5
Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în furnizarea unei metode complementare de autentificare a produselor alimentare, probe lichide, în special vin, după compușii de aromă specifici, pe baza unor parametri ce nu se modifică în timp sau în urma unor procese tehnologice aplicate produsului.	7
	9
	11
	13
	15
	17
	19

Revendicări

1

3

5

7

9

11

13

15

17

19

21

23

25

27

1. Procedeu de amprentare izotopică a compușilor de aromă din probe lichide, produse lichide de origine naturală, în special vin, prin spectrometrie izotopică, cuplată cu cromatografie de gaze (GC-C-IRMS), **caracterizat prin aceea că** va cuprinde următoarele etape:

a) prepararea unei probe reprezentată de un extract organic al probei lichide ce se dorește a fi analizată, prin extracție lichid-lichid într-un solvent organic, și concentrarea compușilor de aromă,

b) identificarea compușilor de aromă țintă din extractul organic obținut în etapa (a), prin cromatografie de gaze cuplată cu spectrometrie de masă (GC-MS),

c) amprentarea izotopică globală prin combustie pe un analizor elemental (EA-IRMS) a solvenților organici utilizați în etapa (a) și a compușilor de aromă puri, utilizați ca materiale de referință pentru analiza GC-MS de la etapa (b) și GC-C-IRMS de la etapa (d), și

d) amprentarea izotopică specifică a compușilor de aromă din extractul organic obținut în etapa (a) prin GC-C-IRMS, în scopul amprentării izotopice a compușilor de aromă care definesc tipicitatea soiului, inclusiv a celor minoritari, în vederea determinării autenticității originii probelor lichide.

2. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** proba este supusă de cel puțin trei ori unei extracții lichid-lichid ce implică utilizarea unui solvent organic, cum ar fi pentan, eter de petrol, în special diclorometan, urmată de reunirea extractelor și uscarea extractului organic rezultat cu un agent desicant, în special sulfat de sodiu anhidru, și concentrarea lor până la un volum final de 50÷2000 μL .

3. Procedeu conform revendicărilor 1 și 2, **caracterizat prin aceea că** amprentarea izotopică specifică prin GC-C-IRMS a compușilor de aromă din extractul organic se realizează printr-o secvență de măsurare ce conține etape de eliminare a picurilor solvenților utilizați la etapa de extracție a compușilor țintă din probă, pentru analiză rămânând doar compușii de interes, ale căror amprente izotopice vor fi cuantificate.

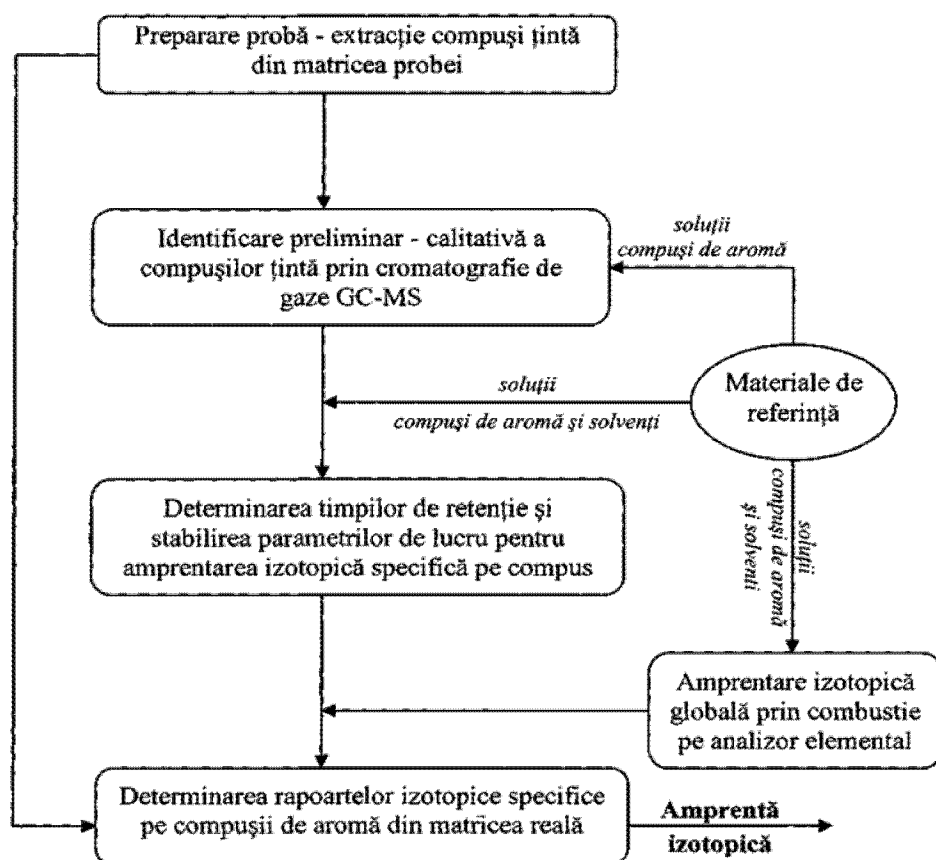


Fig. 1

(51) Int.Cl.

G01N 33/14 (2006.01),

G01N 30/72 (2006.01)

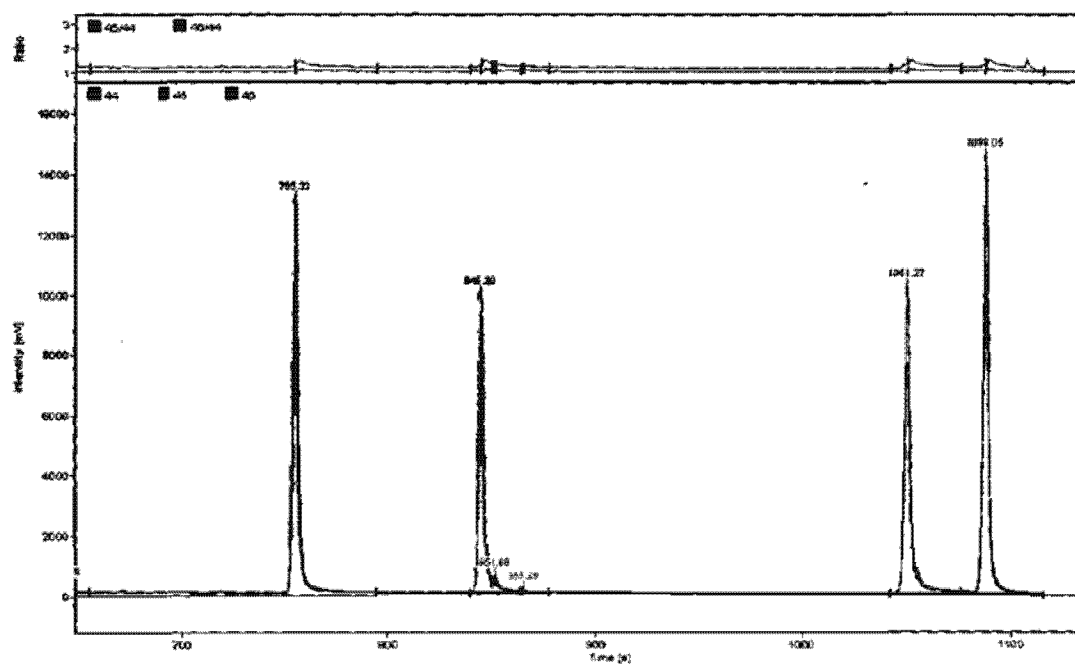


Fig. 2

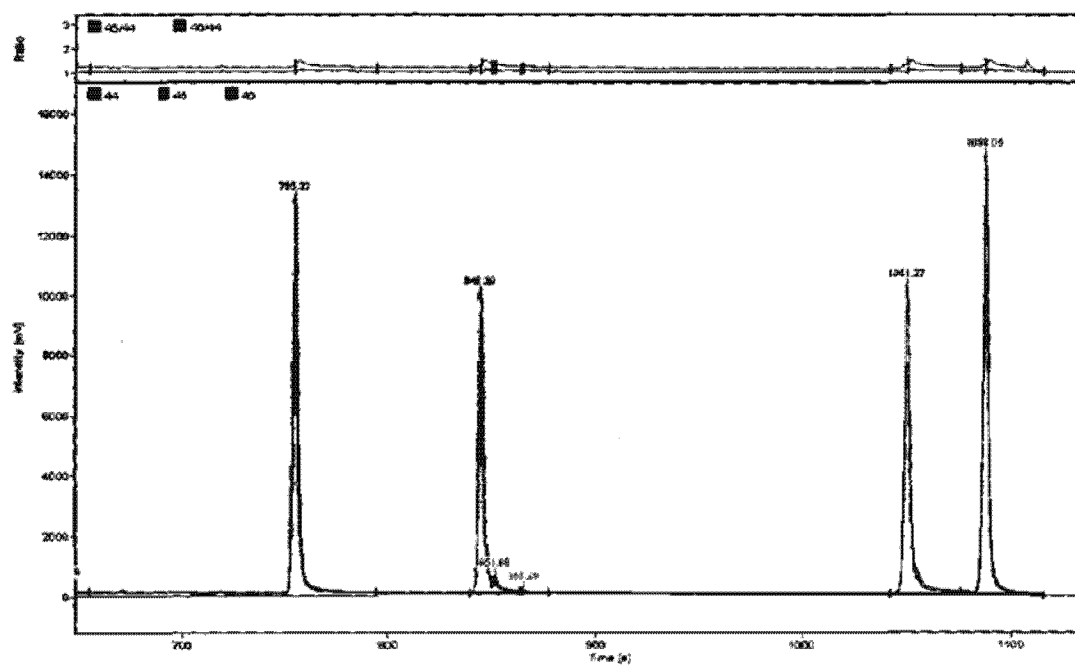


Fig. 3



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 579/2016