



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2011 01333

(22) Data de depozit: 07.12.2011

(41) Data publicării cererii:  
30.07.2013 BOPI nr. 7/2013

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU  
TEHNOLOGII CRIOGENICE ȘI IZOTOPICE  
- ICSI RÂMNICU VÂLCEA, STR.UZINEI  
NR.4, RĂURENI, 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

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

(57) Rezumat:

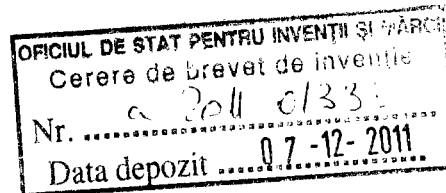
Invenția se referă la o metodă de identificare a compușilor de aromă din vin, care-i definesc profilul aromatic. Metoda conform invenției constă din prepararea probei prin extracția cu solvent în raport de 5:1... 20:1 a compușilor țintă, concentrarea extractelor la un volum de 50...2000 μl, identificarea calitativă, prin cromatografie gazoasă cuplată cu spectrometrie de masă, evaluarea pe fiecare component a rapoartelor izotopice globale, și stabilirea parametriilor de lucru pentru amprentarea izotopică specifică pe compus, marcarea

izotopică cu C13, din care, pe baza timpilor de retenție stabiliți prin injectarea fiecărui compus în parte, și pe baza amprentei izotopice globale măsurate, se creează o secvență de măsurare, moment în care se elimină din sistem solvenții identificați, pe cromatograma obținută rămânând doar vârfurile compușilor de interes, ale căror valori vor fi cuantificate.

Revendicări: 4  
Figuri: 3



DESCRIERE:



76

## Procedeu de amprentare izotopică a compușilor de aromă din probe lichide, în special vin

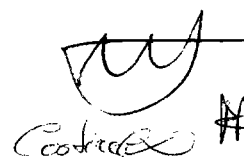
La nivel mondial, în ultima perioadă de timp se fac eforturi intense pentru dezvoltarea de cercetări direcționate spre găsirea de metode analitice performante cu aplicație în autentificarea alimentelor, politica în domeniul calității fiind orientată în special spre dezvoltarea de sisteme de protejare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

Prezenta invenție vine în sprijinul acestui deziderat, rezolvând problema amprentării izotopice complete, global și specific pe compus, a unui lichid, în special vin. Principiul acesteia se bazează pe faptul că raportul natural al izotopilor stabili în materiile organice vegetale nu este constant, ci depinde de conținutul izotopic originar al moleculelor 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 rapoarte izotopice specifice. Izotopii stabili sunt atomi ai aceluiași element, cu o greutate atomică diferită cu câteva unități de masă, ca urmare a numărului diferit de neutroni în nucleu și care nu se degradează prin procese radioactive în timp. Pentru stabilirea autenticității unui produs, luându-se în considerare izotopii stabili (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), determinarea rapoartele izotopice (raportul dintre izotopul greu și cel ușor al aceluiași element) sunt în mod cert mult mai utile decât alte 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 ele larg reprezentate (oxigenul de la apă la zahăruri, alcooli, acizi, saruri, arome, polifenoli etc. iar azotul la peptide, aminoacizi, proteine etc.).

Evaluarea compoziției naturale în izotopi stabili a unei probe lichide, în particular vin, constituie una din aplicațiile cele mai performante ale chimiei analitice, prin care putem stabili relații de legătură între produsul finit (de exemplu vin) și materiile prime (de exemplu apa și  $\text{CO}_2$ ) din mediul lor natural.

În natură majoritatea bio-elementelor reprezintă amestecuri de doi sau mai mulți izotopi stabili. S-a observat ca din punct de vedere al conținutului izotopic variația moleculelor depinde de originea lor. Variabilitatea este legată de conținutul izotopic al



  
Costin R. Burek

3

rezervorului de plecare și de fracționarea izotopică asociată cu procesele fizice, etapele chimice 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 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, observându-se rapoarte izotopice mai mari în apa din plante comparativ cu cea din apele subterane.

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

Literatura de specialitate [1-4] prezintă o diversitate de metode de investigare a lichidelor, în special vin, de la metode analitice generale [5, 6] până la metode specifice [7].

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 Figura 1, plecând de la prepararea probei și extracția compușilor țintă (pasul I), identificarea lor preliminar calitativă (pasul II), determinarea timpilor de retenție și stabilirea parametrilor de lucru pentru amprentarea izotopică specifică pe compus (pasul III) și terminând cu amprentarea lor izotopică globală (pasul IV) și specifică (pasul V).

Un prim pas esențial în amprentarea izotopică a compușilor de aromă constă în extracția compușilor țintă din matricea probei astfel încât solvenții utilizați să interfere cât 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, 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, minim trei, cu o durată individuală cuprinsă între 10 - 60 min, având rapoartele volumetrice proba:solvent într-o plajă de valori de 5:1 - 25:1. Extractele organice se reunesc și se usuca 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 pentru determinările prin cromatografie de gaze. Avantajele aduse de această metodă constau în reducerea timpului de extracție, utilizarea unor solvenți indigeni, o mai buna reproductibilitate, simplitate și rapiditate și costuri scăzute, nefiind necesare echipamente de laborator sofisticate și nici personal tehnic cu o pregătire specială.

Din extractul astfel obținut se identifică compușii de aromă (pasul II) prin utilizarea cromatografiei de gaze cuplată cu spectrometrie de masă. Parametrii de funcționare ai



Costerec  
# R. R. R. R. R.

cromatografului de gaze utilizați pentru acest tip de determinare sunt: split (diluarea probei injectate): fără split - split 50:1, în special split de 10:1; tip coloana cromatografică: coloană capilară cu fază staționară de polaritate medie sau mare, în special din polietilenglicol; volumul de proba injectat între 0,1 - 10μl, în special 1μl; temperatura injector în intervalul 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 între 70 - 250°C, în special 150-200°C; viteza de creștere a temperaturii cuptorului cromatografic între 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 masa (Full EI); și domeniu de citire a maselor în intervalul 10 - 400 m/z, în special 30 - 150 m/z.

Compușii de aromă se vor identifica prin a) compararea spectrelor de masă ale acestora cu o bancă de spectre de masă existentă în memoria internă a instrumentului de analiză, b) compararea spectrelor de masă a compușilor de aromă cu cele ale compușilor de referință și prin 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.

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 a solvenților implicați în prepararea probei, a materialelor de referință certificate, amprentate izotopic global în pasul IV și stabilirea parametrilor de lucru atât pentru gaz cromatograf, 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 ex. TG-WAXMS) și a materialelor de referință specifice acestora. Tipul de injectare folosit este de tip splitless, iar pentru evitarea lărgirii picului, split-ul este deschis 10 secunde după injectare, curgere splitare 50 ml/min. Gradientii de temperatură au fost aleși pentru a exploata la maxim lungimea coloanei: cu cât este mai mare lungimea coloanei, cu atât crește mai lent temperatura pe minut (ex. min. 3°C/min). Presiunea din coloană și viteza eluentului (ex. Helium puritate 99,9999%) este setată pentru a se potrivi diametrului coloanei capilare (min. 1 bar). Pentru a ajuta la focalizarea probei injectate și 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 minim 1 m lungime. Conversia probei în gaze



Handwritten signature and initials at the bottom right of the page.

simple necesită utilizarea unei interfețe de combustie între gaz cromatograf și spectrometru 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 aprox. 960 °C. Pentru a elimina vaporii de apă generați în timpul combustiei, efluentul trece printr-o trapă din nafion. Nafionul este un polimer fluorinat care reactionează 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<sub>2</sub> producând HCO<sub>2</sub><sup>+</sup>, care interferă cu analizele de CO<sub>2</sub> (interferență izobară). Pentru fiecare secvență de analiză a unei probe, trebuie verificat ca deviația standard (SD Standard Deviation) la 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 <sup>13</sup>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.

Anterior amprentării izotopice specifice a compușilor de aromă din probă, se realizează o evaluare a rapoartelor izotopice globale (pasul IV) atât pe solvenții ce intervin la prepararea și extracția compușilor țintă din matricea probei cât și pe compușii de aromă/compuși organici volatili puri, nediluți, utilizați ca materiale de referință, compuși ce sunt folosiți ulterior în etapa de determinare a timpilor de retenție pe coloana capilară și stabilirea parametrilor de lucru pentru amprentarea izotopică specifică pe compus.

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 alcoolii, acizi, esteri, terpene, compuși carbonilici etc. ce se pot regăsi în probele lichide, în special vin;
- solvenți organici, ce sunt reprezentați de solvenții de extracție și solvenți în care se dizolvă compușii de aromă, de exemplu etanol, metanol, acetona, 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 ± 20% față de valorile concentrației compusului de aromă din proba lichidă, în special vin.



*[Handwritten signature]*  
*[Handwritten signature]* # *[Handwritten signature]*

82

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 cuplat la un spectrometru de masă IRMS. Gaz cromatografic permite într-o primă fază separarea compușilor din extract pe coloana cromatografică și apoi identificarea timpilor de reținere pe coloană și crearea unei metode de lucru astfel încât prin cuptorul de combustie sau piroliză să treacă doar compușii țintă, restul fiind eliminați de pompa de vid preliminar. Măsurătorile prin spectrometrie de masă izotopică sunt derulate prin analiza compușilor gazoși (de ex. H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> sau N<sub>2</sub>) obținuți prin combustia sau piroliza probei pentru determinarea conținutului în izotopi stabili ai elementelor componente (de ex. 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. Raportul izotopic este exprimat ca fiind deviația ‰ în raport cu un standard internațional de referință:

$$\Delta X \text{ ‰} = \frac{R_{\text{proba}} - R_{\text{refer int a}}}{R_{\text{refer int a}}} \times 100$$

unde X = <sup>2</sup>H/<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C, <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N respectiv <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O, iar R<sub>proba</sub> și R<sub>referinta</sub> sunt rapoartele izotopice pentru proba și standardul de referință internațional. Toate valorile rapoartelor izotopice obținute vor alcătui o amprenta izotopică specifică fiecărui compus, contribuind la alcătuirea unui profil aromatic tipic unui vin autentic.

În figurile 2 și 3 sunt prezentate rezultate experimentale privind amprentarea specifică a compușilor de aromă.

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.



Handwritten signatures and initials, including 'Contrace' and 'R. Bărcă'.

**REVENDICARI:**

**1. Metoda de extracție a compușilor de aromă din probe lichide, în special vin,** caracterizată prin aceea că include *a)* un număr de extracții cu solvent organic, minim trei, *b)* reunirea și uscarea extractelor, urmate de *c)* concentrarea lor la un volum final de 50-2000  $\mu$ l.

**2. Metoda de identificare a compușilor de aromă țintă** prin cromatografie de gaze cuplată cu spectrometrie de masă caracterizată prin aceea că identificarea se realizează într-o succesiune de pași *a)* prin compararea spectrelor de masă a compușilor cu banca de spectre de masa existentă în memoria internă a instrumentului de analiza, *b)* compararea spectrelor de masă a compușilor de aromă cu cele ale compușilor de referință și prin *c)* compararea timpilor de retenție pe coloana cromatografică a analiților cu timpii de retenție ai compușilor de referință.

**3. Metoda de amprentare izotopică globală prin combustie pe un analizor elemental** caracterizată prin aceea că identificarea rapoartelor izotopice globale pentru solvenții care intervin la prepararea și extracția compușilor țintă din matricea probei și compușii de aromă/compuși organici volatili puri, nediluți, utilizați ca materiale de referință, compuși ce vor fi utilizați ulterior la determinarea timpilor de retenție pe coloana capilară și stabilirea parametrilor de lucru pentru amprentarea izotopică specifică pe compus se face prin combustia probei și reducerea pe coloana de reducere a amestecului de gaz obținut la  $\text{CO}_2$  unde spectrometrul de masa IRMS furnizează amprenta izotopică globală a compusului (ex. Carbon 13) iar prin ionizarea moleculelor prin bombardament electronic în sursa de ioni a spectrometrului, apare un proces de fragmentare (moleculele sunt „rupte”, dissociate în părțile lor componente, constituind fragmente, radicali liberi, chiar atomi) caracteristic fiecărei molecule, în urma lui rezultând o carte de identitate sub forma unui „spectru de fragmentare” unde fragmentele care se formează (ionii) sunt accelerate de un câmp electric sau magnetic, ce le separa în funcție de raportul masă/sarcină electrică ( $m/z$ ), apoi detectorul transformă ionii separati în semnale electrice proporționale cu numărul de ioni, permițând astfel înregistrarea spectrului de masă caracteristic fiecărei substanțe organice iar injectarea probei lichide (ex. solvenți, materiale de referință certificate pure) se face cu ajutorul unei seringi microlitrică, cantitatea injectată fiind de ordinul  $\mu$ l și unde curgerea eluentului (Helium puritate 99,9999%) prin analizorul elemental este de minim 90 ml/min și a oxigenului prin cuptorul de combustie de 250 ml/min timp de 1 secundă, presiunea gazului de referință ( $\text{CO}_2$  puritate



*[Handwritten signature]*  
Căstăcelu  
*[Handwritten signature]*

99,998%) este stabilită la minim 1 bar la interfața analizorului elemental cu spectrometrul de masă iar gazul CO<sub>2</sub> va fi separat din amestecul de gaze obținut prin combustie prin trecerea acestuia pe o coloana cromatografică de tip PoraPlot de 1,5 m, la temperatura de 50<sup>0</sup>C.

**4. Metoda de determinare a amprentei izotopice specifice a compușilor de aromă din matrice reală** caracterizată prin aceea că pe baza timpilor de retenție stabiliți prin injectarea fiecărui compus în parte (ex. solvenți, materiale de referință certificate), cu amprenta izotopică globală măsurată se crează o secvență de achiziție/măsurare ce conține și etape de backflush - de eliminare în afara sistemului doar a solvenților utilizați la etapa de extracție a matricei probei și care sunt identificați pe cromatogramă, pentru a nu ajunge în sursa de ionizare a spectrometrului de masă astfel încât, pe cromatograma obținută vor rămâne doar peak-urile compușilor de interes, ale căror valori vor fi cuantificate și unde variațiile mici ce pot să apară în timpul măsurătorii on-line sunt datorate modificărilor condițiilor instrumentale iar în cazul determinării valorilor raportului izotopic  $\delta^{13}\text{C}$  pentru compușii țintă din probă se corectează mai întâi valorile obținute pentru etaloane de lucru și materiale de referință și anume: prin diferența dintre valoarea  $\delta^{13}\text{C}$  măsurată și valoarea lor obținută la măsurarea cu analizorul elemental iar între două măsurători ale aceleiași probe, variația, și deci corecția, trebuind să fie liniară iar probele cu etaloane de lucru și materialele de referință sunt măsurate la începutul și sfârșitul tuturor seriilor de probe apoi, folosind interpolarea liniară, se determină o corecție pentru fiecare probă astfel încât pentru fiecare dintre ele deviația standard (SD Standard Deviation) la trei măsurători succesive ale aceleiași probe se verifică să fie mai mică de 0,6 ‰ rezultatul final pentru probă este dat de valoarea medie pentru trei măsurători iar dacă deviația este mai mare de 0,6 ‰, măsurătoarea trebuie repetată avându-se în vedere ca valoarea  $^{13}\text{C}$  a etalonului de lucru să nu difere cu mai mult de 0.5‰ față de valoarea admisă (certificată) iar în caz contrar se ajustează și se verifică setările spectrometrului asigurându-se că verificarea unei măsurători corecte se face prin măsurarea curentului de ioni pentru masa  $m/z=44$ , care este proporțional cu cantitatea de carbon injectată în sistem unde în condiții standard, curentul de ioni este aproximativ constant pentru probele analizate iar o deviație semnificativă indică faptul că există ori o separare imperfectă în coloana capilară și oxidarea probei ori o instabilitate a spectrometrului de masă.



*[Handwritten signature]*  
Căciucea H. Băneț



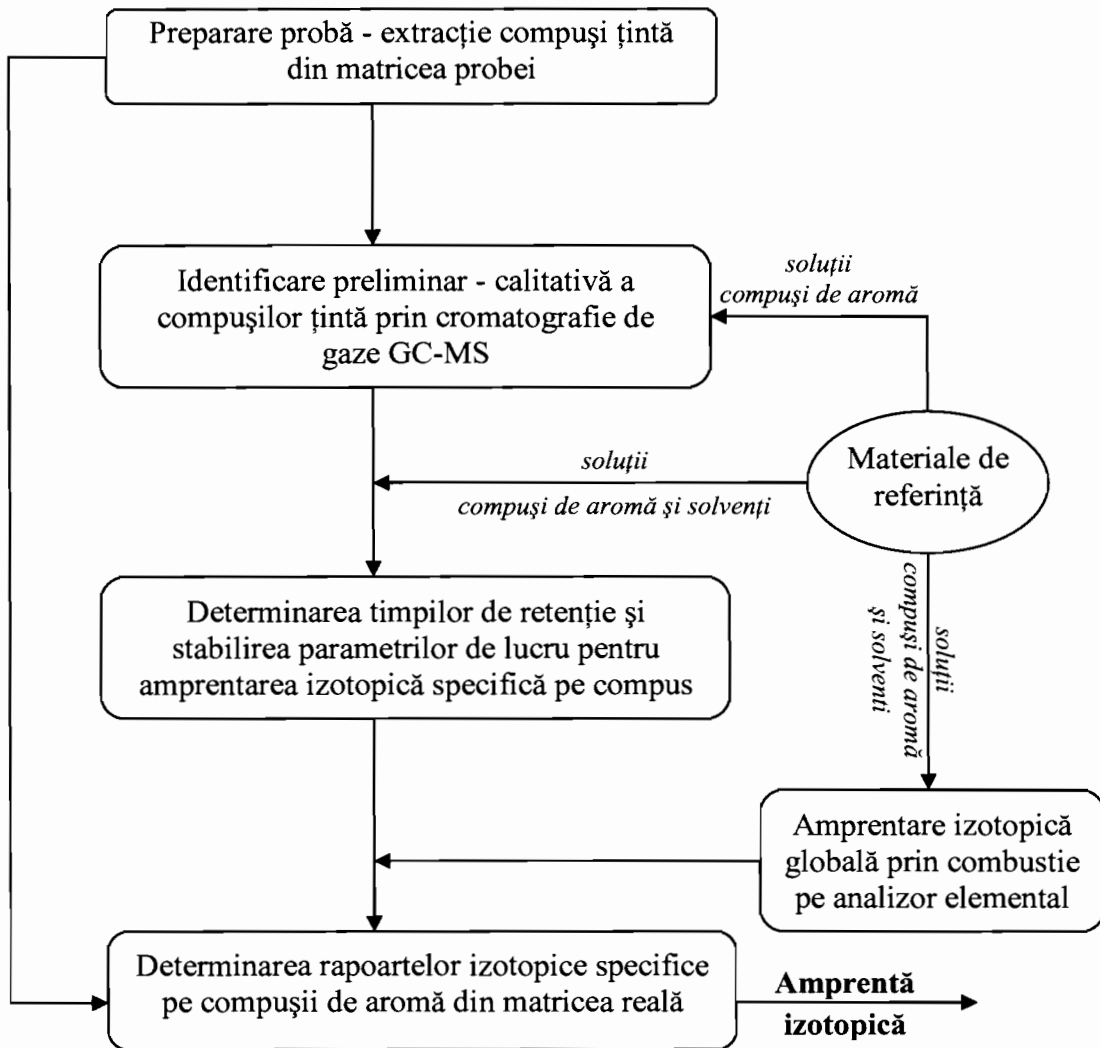


Figura 1. Modelul conceptual de amprentare izotopică specifică pe compus pentru o probă lichida, în special vin



Handwritten signatures and initials, including 'Căciucă' and 'Răduț'.

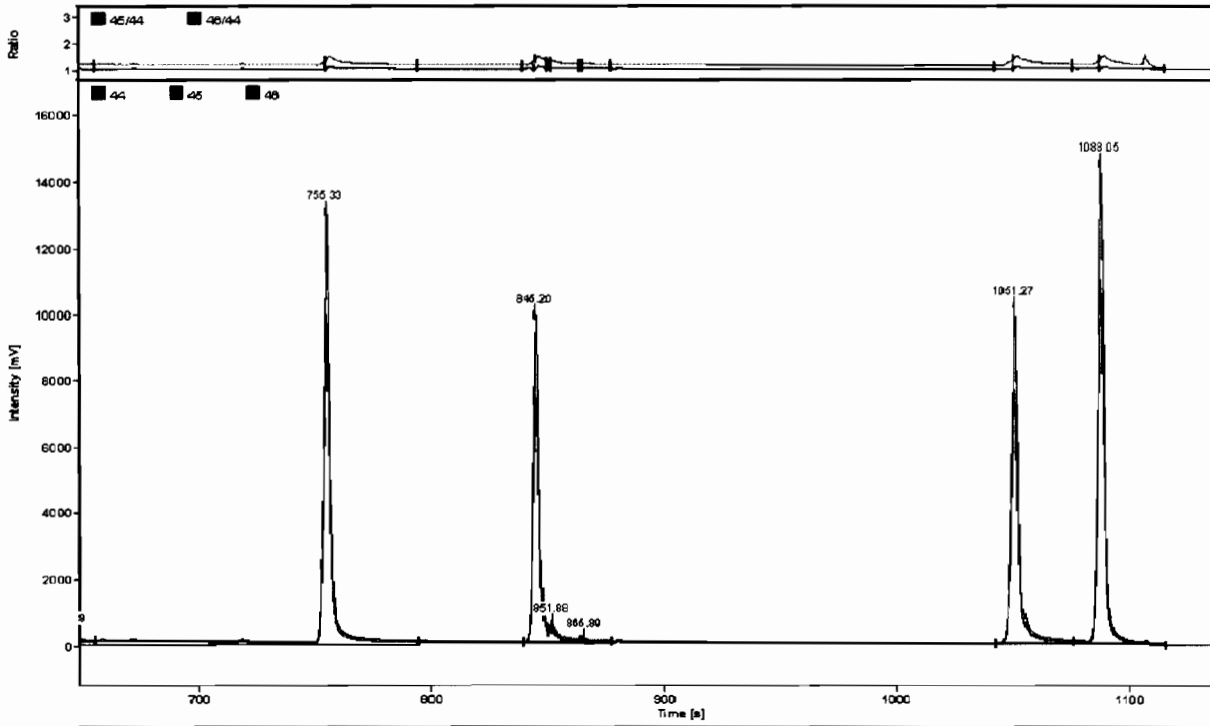


Figura 2. Matrice conținând un amestec indus de 4 compuși organici volatili (arome):  
1-Hexanol, Etil octanoat, Etil decanoat și Dietil succinat (coloana TG-WAXMS  
30mx0,25mmx0,25μm, modul de injectare splitless, curgere splitare 50ml/min, eluent Helium 1  
bar, gazreferință CO2 1,1 bar, temperatura start 400C, izoterma 3 minute, rata încălzire  
70/min până la 2200C)



*[Handwritten signature]*  
Cooker... R. R. R.

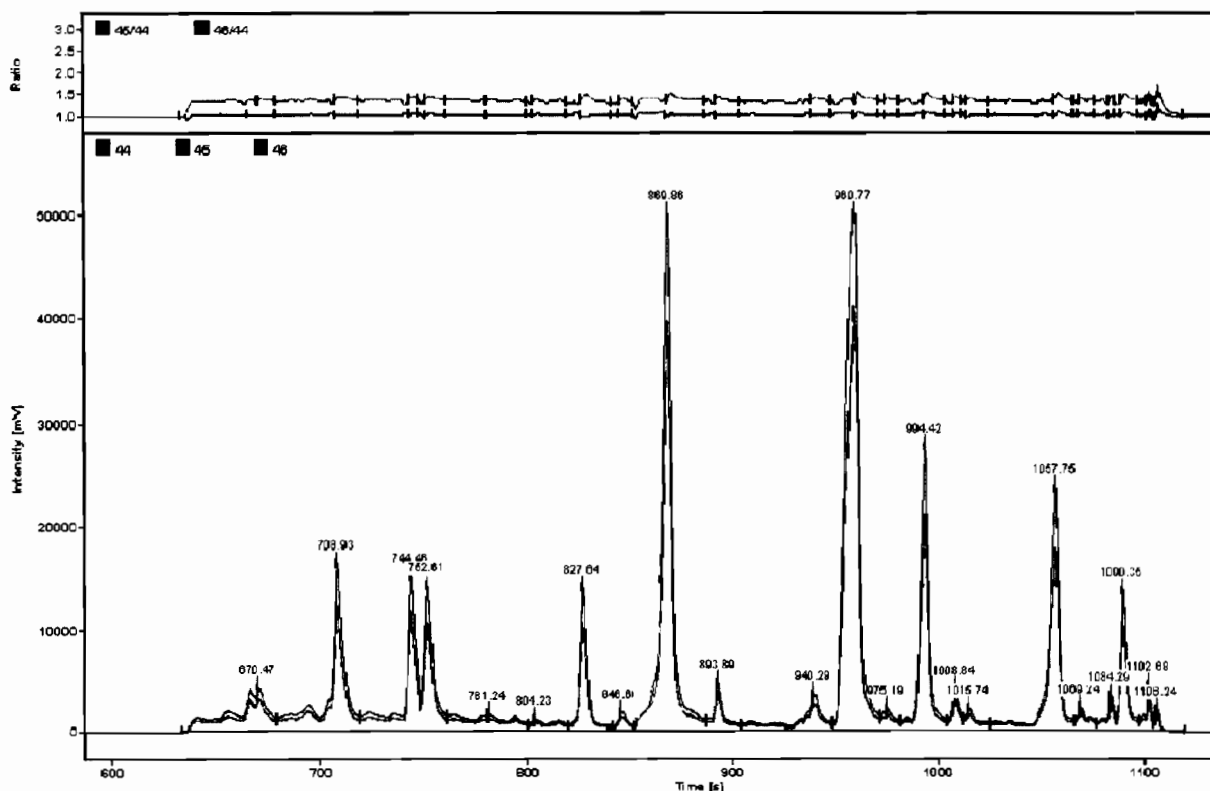


Figura 3. Matrice reala de vin (coloana TG-WAXMS 30mx0,25mmx0,25µm, modul de injectare splitless, curgere splitare 50ml/min, eluent Helium 1 bar, gaz referinta CO2 1,1 bar, temperatura start 400C, izoterma 3 minute, rata incalzire 70/min pana la 2200C)



*[Handwritten signatures]*