



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENTIE

(21) Nr. cerere: **a 2012 00330**

(22) Data de depozit: **14.05.2012**

(41) Data publicării cererii:
29.11.2013 BOPI nr. **11/2013**

(71) Solicitant:
• INCDO-INOE 2000, FILIALA INSTITUTUL
DE CERCETĂRI PENTRU
INSTRUMENTAȚIE ANALITICĂ,
STR.DONATH NR.67, CLUJ-NAPOCA, CJ,
RO

(72) Inventatori:
• MICLEAN MIRELA, STR.AVRAM IANCU
NR. 158, BL.E, AP.5, FLOREȘTI, CJ, RO;
• CADAR OANA, STR. MIGDALULUI NR. 14,
AP. 20, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• ROMAN CECILIA, STR. PIATA ABATOR,
BL.B, AP.5, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• LEVEI ERIKA, STR. EROIILOR NR. 76,
AP. 8, FLOREȘTI, CJ, RO

(54) METODĂ DE DETERMINARE MULTIREZIDUALĂ A FTALATILOR ÎN PROBE ALIMENTARE DE LAPTE PRIN EXTRACTIE ULTRASONICĂ, MICROEXTRACTIE ÎN FAZĂ SOLIDĂ ÎN HEADSPACE ȘI GAZ CROMATOGRAFIE CUPLATĂ CU SPECTROMETRIE DE MASĂ (USE-HS-SPME-GC/MS)

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă analitică de determinare a ftalatilor din probe de lapte. Metoda conform inventiei constă din extractia cu ultrasunete a probelor de lapte cu un amestec de solvenți ciclohexan:diclorometan, la temperatura ambientă, timp de 15...30 min, urmată de evaporarea extractului, apoi de distrugerea acidă a

lipidelor, microextractia în faza solidă a analitilor și determinarea simultană a celor 6 esteri ftalici prin gaz cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă.

Revendicări: 1

Figuri: 1

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de inventie a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de inventie este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



212-222

14 -05- 2012

Descrierea inventiei

Metodă de determinare multireziduală a ftalaților în probe alimentare de lapte prin extracție ultrasonică, microextracție în fază solidă în headspace și gaz cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă (USE-HS-SPME-GC/MS)

DESCRIERE

Invenția se referă la o metodă analitică de determinare multireziduală, rapidă, simplă și sensibilă a 6 esteri ftalici (dimetil ftalat – DMP, dietil ftalat – DEP, dibutil ftalat – DBP, butilbenzil ftalat – BBP, di-(2-ethylhexil) ftalat - DEHP și di-n-octil ftalat - DNOP) în probe de lapte, prin extractie cu ultrasonare, urmată de microextractie în fază solidă în headspace și gaz cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă (USE-HS-SPME-GC/MS).

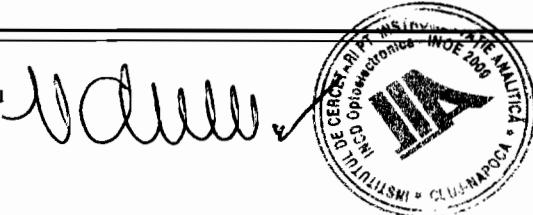
Extracția ultrasonică se poate aplica pentru compuși organici nevolatili sau semi-volatili, cum sunt esterii ftalici, din probe lichide/fluide, cum este laptele.

Esterii ftalici sunt aditivi larg utilizati în producția materialelor plastice, pentru creșterea flexibilității acestora. Utilizarea lor excesivă a dus la contaminarea factorilor de mediu, inclusiv a laptelui, fiind considerați poluanți de mediu ubicuitari. Datorită proprietăților lor fizico-chimice, ftalații migrează ușor din ambalaje în alimente. Concentrațiile cele mai ridicate de ftalați s-au determinat în produsele alimentare grase, cum sunt laptele, carnea, peștele, uleiurile vegetale [1]. Unii esteri ftalici, cum sunt BBP, DBP și DIBP au efecte estrogenice, influențând negativ sistemul endocrin uman și animal [2].

Datorită concentrațiilor extrem de scăzute ale ftalațiilor în probe de lapte sunt necesare metode de extractie și determinare foarte sensibile și precise.

În străinătate se aplică metode analitice cuplate pentru extracția, detecția și cuantificarea esterilor ftalici în probe de lapte, apă, ulei de măslini, derivate din carne, cum sunt: extracția lichid-lichid (LLE), extracția în fază solidă (SPE), microextracția în fază solidă în headspace (HS-SPME), extracția prin sorbție pe agitator magnetic (SBSE) urmată de determinare prin gaz/lichid cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă (GC-MS, LC-MS) [1, 2, 3, 4, 5]. De asemenea, în ultimii ani s-au dezvoltat metode de pretratament a probelor solide prin ultrasonare pentru determinarea bifenililor policlorurați și a pesticidelor organoclorurate [6, 7].

Director ICIA,
CS II Mircea Chinteanu



Descrierea invenției

În țară, s-a realizat și aplicat o metodă de determinare a esterilor ftalici din probe de lapte prin tehnica microextracție în fază solidă în headspace și gaz cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă (HS-SPME-GC/MS) [8]. După informațiile noastre nu s-a utilizat sau aplicat o metodă analitică pentru determinarea esterilor ftalici în probe de lapte USE-HS-SPME-GC/MS.

Scopul prezentei invenții este elaborarea unei metode analitice de determinare multicomponent a 6 esteri ftalici (DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP și DNOP) în probe alimentare (lapte), prin extractie cu ultrasonare urmată de microextracție în fază solidă în headspace și gaz cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă (USE-HS-SPME-GC/MS).

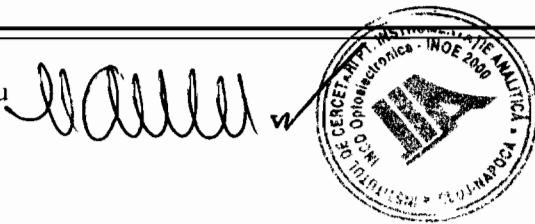
Problemele tehnice pe care le rezolvă invenția sunt:

- Reduce timpul de extractie cu 90% față de metodele convenționale (extractia Soxhlet dureaza 10-16 ore).

Avantajele metodei:

- metoda de extractie USE permite extractia eficientă a ftalațiilor din probe alimentare complexe, cum este laptel, permite obținerea unor limite de detecție extrem de scăzute, este mai rapidă, mai ieftină și scade consumul de solventi organici toxici comparativ cu metodele convenționale;
- metoda de extractie SPME este rapidă, simplă și nu utilizează solventi organici și concentrează într-o singură etapă extractia și concentrarea analitilor, iar prin imersarea fibrei în headspace (HS) se elimină coextractia altor compusi organici din matricea probei (de exemplu, lipide) aşa cum s-ar putea produce în cazul extractiilor convenționale (de exemplu, Soxhlet);
- separarea, identificarea, detectia și cuantificarea analitilor se realizează simultan prin GC-MS pe coloană capilară nepolară, în modul SIM (monitorizarea ionilor selectați), astfel încât metoda analitică propusă de determinare a 6 ftalați în probe de lapte este economică, rapidă, foarte versatilă, extrem de sensibilă.

Metoda propusă permite determinarea multireziduală a 6 esteri ftalici (DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP și DNOP) în probe de lapte. Metoda folosită la pre-extractia analitilor din probe este ultrasonarea (USE), urmată de concentrarea extractului, apoi distrugerea lipidelor pentru eliminarea interferențelor matricei, reluarea analitilor cu apă, microextractia lor în fază solidă în headspace, separarea analitilor pe

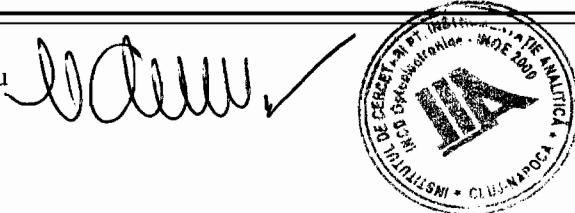


Descrierea invenției

coloană capilară nepolară, identificarea și cuantificarea lor prin spectrometrie de masă în modul SIM, pentru creșterea sensibilității metodei.

După recoltare, proba de lapte a fost omogenizată și s-a supus preextractiei cu ultrasonare. Pentru aceasta, s-a cântărit cu exactitate o masă m la care s-a adaugat un volum V de ciclohexan:diclorometan, în raport 3:1 (v/v), într-un flacon de sticlă. Flaconul s-a introdus în baia de ultrasonare, menținând nivelul apei deasupra nivelului de solvent din flacon și proba s-a supus extractiei ultrasonice timp de 15...30 min, la o frecvență și putere de 35 kHz și respectiv 320 W. După sonicare, extractul a fost filtrat prin hârtie de filtru, iar în reziduul solid s-a adaugat un volum V de amestec de solvenți ciclohexan:diclorometan, 3:1 (v/v), și s-a resupus extractiei ultrasonice timp de 15...30 min, analog primei extractii. După sonicare, extractul a fost filtrat prin hârtie de filtru, iar reziduul solid a fost spălat succesiv cu câte v_1 ml amestec de solvent de extractie. Extractiile a avut loc la temperatură ambientă. Filtratele obținute s-au reunit într-un flacon sferic și s-au supus evaporării la rotavapor, până la un volum de 1 ml. Anterior extractiei SPME, s-a realizat distrugerea lipidelor pentru eliminarea acestor interferențe. Pentru aceasta, la volumul obținut de 1 ml s-au adaugat v_2 ml acid sulfuric 20...40%, s-a agitat flaconul până ce statul organic a fost incolor. Extractul obținut s-a evaporat la rotavapor până aproape de sec, apoi s-a introdus într-un flacon pentru headspace și s-a evaporat la sec sub un flux de azot. Pentru extractia HS-SPME, reziduul probei s-a reluat cu v_3 ml apă ultrapură, s-au adaugat m_1 g NaCl pentru facilitarea volatilizării analitilor, s-a introdus un agitator magnetic pentru omogenizarea amestecului, apoi flaconul s-a sigilat cu dop cu septum de PTFE. Flaconul s-a introdus într-o baie de încălzire la 60...90°C, viteza de agitare s-a reglat la 700...1000 rot/min, apoi fibra SPME de tip PDMS-100 μm s-a introdus în spațiul de deasupra probei (în headspace), iar extractia s-a efectuat timp de 70...90 min. Analog s-a preparat o probă blanc, a reactivilor. Analiza probei s-a efectuat prin GC-MS.

Analiza gaz cromatografică a celor 6 esteri ftalici s-a efectuat prin injectarea fibrei în inletul gaz cromatografului, în modul „splitless”, menținut izoterm la 280°C, timpul de desorbție fiind de 10 minute. Coloana capilară nepolară utilizată a fost de tip HP-5MS, 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm. Gazul purtător He de înaltă puritate, cu un debit de 1 ml/min. Programul aplicat pentru temperatura coloanei în GC a fost următorul: temperatura inițială este de 100°C, de la 100 la 260°C cu o rampă de



Descrierea invenției

8°C/min; de la 260 la 310°C cu o rampă de 35°C/min și menținută la 310°C pentru 10 minute. Operarea spectrometrului de masă s-a efectuat în modul SIM pentru cei 6 analiți, pentru fiecare din acești alegându-se ionii de identificare și cuantificare specifici. Au fost monitorizați următorii ioni: 77, 91, 149, 150, 163, 167, 177, 279.

Metoda USE-HS-SPME-GC/MS propusă este eficientă pentru determinarea multireziduală a 6 esteri ftalici în probe de lapte la nivel de urme. Prin cuplarea tehniciilor de extractie USE și SPME se obține o tehnică mai eficientă, în comparație cu aplicarea celor două metode singure, scurtând timpul de preparare a probelor, crescând sensibilitatea metodei și reducând volumele de solvenți organici utilizate.

Parametrii de performanță ai metodei de determinare a celor 6 ftalați (DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP și DNOP) în lapte, prin USE-HS-SPME-GC/MS sunt:

- limitele de cuantificare pentru cei 6 analiți variază între 0,62–1,95 µg/kg;
- gradele de recuperare pentru cei 6 analiți variază între 95–102 %.

1. Serodio P., Nogueira J.M.F., Considerations on ultra-trace analysis of phthalates in drinking water, *Water Research*, 40, **2006**, 2572 – 2582.
2. Amiridou D., Voutsas D., Alkylphenols and phthalates in bottled waters, *Journal of Hazardous Materials*, 185, **2011**, 281–286.
3. Feng Y.L., Zhu J., Sensenstein R., Development of a headspace solid-phase microextraction method combined with gas chromatography mass spectrometry for the determination of phthalate esters in cow milk, *Analytica Chimica Acta*, 538, **2005**, 41–48.
4. Cavaliere B., Macchione B., Sindona G., Tagarelli, A., Tandem mass spectrometry in food safety assessment: The determination of phthalates in olive oil, *Journal of Chromatography A*, 1205, **2008**, 137–143.
5. Guo Z., Wang S., Wei D., Wang M., Zhang H., Gai P., Duan J., Development and application of a method for analysis of phthalates in ham sausages by solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry, *Meat Science*, 84, **2010**, 484–490.
6. Lambropoulou D.A., Konstantinou I.K., Albanis T.A., Sample pretreatment method for the determination of polychlorinated biphenyls in bird livers using ultrasonic extraction followed by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1124, **2006**, 97–105.
7. Lambropoulou D.A., Konstantinou I.K., Albanis T.A., Coupling of headspace solid phase microextraction with ultrasonic extraction for the determination of chlorinated pesticides in bird livers using gas chromatography, *Analytica Chimica Acta*, 573–574, **2006**, 223–230.
8. Miclean M., Cadar O., Roman C., Determination of phthalates in bottled milk using Headspace Solid-Phase Microextraction coupled with Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *Studia Universitatis Babes-Bolyai CHEMIA*, 57(1), **2012**, 127-133.

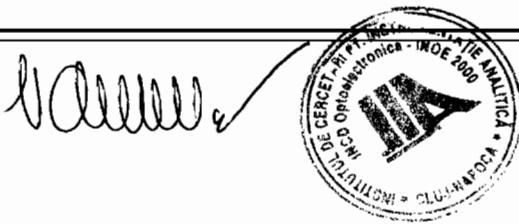


Revendicare

REVENDICARE

Metodă de determinare multireziduală a ftalațiilor în probe alimentare de lapte prin extractie ultrasonică, microextractie în fază solidă în headspace și gaz cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă caracterizată prin aceea că are la bază determinarea a 6 esteri ftalici (dimetil ftalat, dietil ftalat, dibutil ftalat, butilbenzil ftalat, di-(2-ethylhexil) ftalat și di-n-octil ftalat) în lapte, prin tehnica USE-HS-SPME-GC/MS, prin extractia cu ultrasunete a probelor cu amestec de solventi ciclohexan:diclorometan, la temperatura ambiantă, timp de 15...30 min, urmată de evaporarea extractului, apoi de distrugerea acidă a lipidelor, microextractia în fază solidă a analitilor și determinarea simultană a celor 6 analiți prin gaz cromatografie cuplată cu spectrometri de masă.

Director ICIA,
CS II Mircea Chintoanu

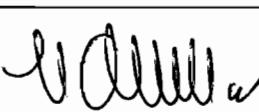


Desene

DESENE

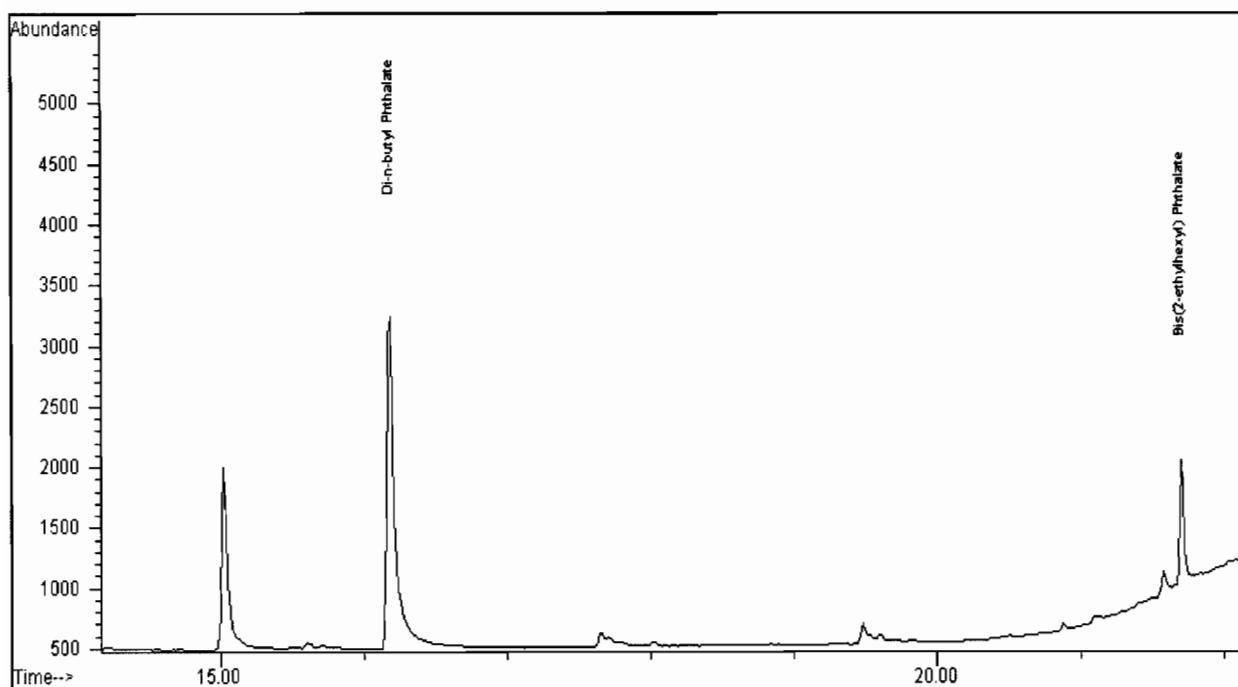
Figura 1. Cromatograma GC/MS-SIM a unei probe de lapte pentru determinarea esterilor ftalici prin USE-HS-SPME-GC/MS

Director ICIA,
CS II Mircea Chintoaanu



0-2012-00330--
14-05-2012

Figura 1. Cromatograma GC/MS-SIM a unei probe de lapte pentru determinarea esterilor ftalici prin USE-HS-SPME-GC/MS



Director ICIA,
CS II Mircea Chintanu

