



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2012 00330

(22) Data de depozit: 14/05/2012

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: 30/09/2016 BOPI nr. 9/2016

(41) Data publicării cererii:
29/11/2013 BOPI nr. 11/2013

(73) Titular:
• 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, BLE, AP.5, FLOREȘTI, CJ, RO;
• CADAR OANA-ALINA, STR.MIGDALULUI
NR.14, AP.20, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• ROMAN CECILIA, PIAȚA ABATOR, BL.B,
AP.58, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• LEVEI ERIKA, STR. EROILOR NR. 76,
AP. 8, FLOREȘTI, CJ, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:
MICLEAN M. ȘI COL., "DETERMINATION
OF PHTHALATES IN BOTTLED MILK
USING HEADSPACE SOLID-PHASE

MICROEXTRACTION COUPLED WITH GAS
CHROMATOGRAPHY-MASS
SPECTROMETRY", THE STUDIA
UNIVERSITATIS BABES-BOYAI, NR. 1,
2012; GUO Z. ȘI COL., "DEVELOPMENT
AND APPLICATION OF A METHOD FOR
ANALYSIS OF PHTHALATES IN HAM
SAUSAGES BY SOLID-PHASE
EXTRACTION AND GAS
CHROMATOGRAPHY-MASS
SPECTROMETRY", MEAT SCIENCE, VOL.
84, PP. 484-490, 2010; LAMBROPOULOU
D. ȘI COL., "SAMPLE PRETREATMENT
METHOD FOR THE DETERMINATION OF
POLYCHLORINATED BYPHENYLS IN
BIRD LIVERS USING ULTRASONIC
EXTRACTION FOLLOWED BY
HEADSPACE SOLID-PHASE
MICROEXTRACTION AND GAS
CHROMATOGRAPHY-MASS
SPECTROMETRY", JOURNAL OF
CHROMATOGRAPHY A, VOL. 1124,
PP. 97-105, 2006

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



1 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, butil-
3 benzil ftalat - BBP, di-(2-etilhexil) ftalat - DEHP și di-n-octil ftalat - DNOP) în probe de lapte,
prin extracție cu ultrasonare, urmată de microextracție în fază solidă în "headspace" și gaz
5 cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă (USE-HS-SPME-GC/MS).

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

8 Esterii ftalici sunt aditivi larg utilizați în producția materialelor plastice, pentru crește-
9 rea flexibilității acestora. Utilizarea lor excesivă a dus la contaminarea factorilor de mediu,
inclusiv a laptelui, fiind considerați poluanți de mediu ubicuitari. Datorită proprietăților lor
11 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,
13 uleiurile vegetale [Serodio P., Nogueira J. M. F., "**Considerations on ultra-trace analysis
of phthalates in drinking water**", *Water Research*, **40**, 2006, 2572-2582]. Unii esteri ftalici,
15 cum sunt BBP, DBP și DIBP, au efecte estrogenice, influențând negativ sistemul endocrin
uman și animal [Amiridou D., Voutsas D., "**Alkylphenols and phthalates in bottled
17 waters**", *Journal of Hazardous Materials*, **185**, 2011, 281-286].

18 Datorită concentrațiilor extrem de scăzute ale ftalaților în probe de lapte, sunt necesare
19 metode de extracție și determinare foarte sensibile și precise.

20 În străinătate se aplică metode analitice cuplate pentru extracția, detecția și cuantifi-
21 carea esterilor ftalici în probe de lapte, apă, ulei de măsline, derivate din carne, cum sunt:
22 extracția lichid-lichid (LLE), extracția în fază solidă (SPE), microextracția în fază solidă în
23 "headspace" (spațiul de deasupra probei) (HS-SPME), extracția prin sorbție pe agitator
magnetic (SBSE), urmată de determinare prin gaz/lichid, cromatografie cuplată cu spectro-
25 metrie de masă (GC-MS, LC-MS) [Serodio P., Nogueira J. M. F., "**Considerations on
ultra-trace analysis of phthalates in drinking water**", *Water Research*, **40**, 2006, 2572-
27 2582; Amiridou D., Voutsas D., "**Alkylphenols and phthalates in bottled waters**", *Journal
of Hazardous Materials*, **185**, 2011, 281-286; Feng Y. L., Zhu J., Sensenstein R.,
29 "**Development of a headspace solid-phase microextraction method combined with gas
chromatography mass spectrometry for the determination of phthalate esters in cow
31 milk**", *Analytica Chimica Acta*, **538**, 2005, 41-48; Cavaliere B., Macchione B., Sindona
G., Tagarelli, A., "**Tandem mass spectrometry in food safety assessment: The
33 determination of phthalates in olive oil**", *Journal of Chromatography A*, **1205**, 2008,
137-143; Guo Z., Wang S., Wei D., Wang M., Zhang H., Gai P., Duan J., "**Development
35 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-
37 490]. De asemenea, în ultimii ani s-au dezvoltat metode de pretratament a probelor solide
prin ultrasonare, pentru determinarea bifenililor policlorurați și a pesticidelor organoclorurate
39 [Lambropoulou D. A., Konstantinou I. K., Albanis T. A., "**Sample pretreatment method
for the determination of polychlorinated biphenyls in bird livers using ultrasonic
41 extraction followed by headspace solid-phase microextraction and gas
chromatography-mass spectrometry**", *Journal of Chromatography A*, **1124**, 2006, 97-
43 105; Lambropoulou D. A., Konstantinou I. K., Albanis T. A., "**Coupling of headspace
solid phase microextraction with ultrasonic extraction for the determination of
45 chlorinated pesticides in bird livers using gas chromatography**", *Analytica Chimica
Acta*, **573-574**, 2006, 223-230].

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) [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 Babeș-Bolyai CHEMIA*, 57(1), 2012, 127-133]. 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 multi-component a 6 esterilor ftalici (DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP și DNOP) în probe alimentare (lapte), prin extracție cu ultrasunare, urmată de microextracție în fază solidă în “headspace” și gaz cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă (USE-HS-SPME-GC/MS).

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este aceea că reduce timpul de extracție cu 90% față de metodele convenționale (extracția Soxhlet durează 10...16 h).

Metoda de determinare a ftalaților în probe alimentare de lapte, conform invenției, presupune determinarea a 6 esterilor ftalici, adică dimetil ftalat, dietil ftalat, dibutil ftalat, butilbenzil ftalat, di-(2-etilhexil) ftalat și di-n-octil ftalat, prin extracție ultrasonică, microextracție în fază solidă în “headspace” și gaz cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă, care cuprinde extracția cu ultrasunete a probelor de lapte cu un amestec de solvenți ciclohexan:diclormetan, la temperatura ambiantă, timp de 15...30 min, urmată de evaporarea extractului, apoi de distrugerea acidă a lipidelor, de microextracția în fază solidă a ftalaților de analizat și determinarea simultană a acestora prin gaz cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă.

Avantajele metodei sunt:

- metoda de extracție USE permite extracția eficientă a ftalaților din probe alimentare complexe, cum este laptele, permite obținerea unor limite de detecție extrem de scăzute, este mai rapidă, mai ieftină și scade consumul de solvenți organici toxici, comparativ cu metodele convenționale;

- metoda de extracție SPME este rapidă, simplă și nu utilizează solvenți organici, și concentrează într-o singură etapă extracția și concentrarea analiților, iar prin imersarea fibrei în “headspace” (HS) se elimină coextracția altor compuși organici din matricea probei (de exemplu, lipide), așa cum s-ar putea produce în cazul extracțiilor convenționale (de exemplu, Soxhlet);

- separarea, identificarea, detecția și cuantificarea analiților 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.

Se dă în continuare un exemplu de realizare a invenției, în legătură și cu figura ce reprezintă cromatograma GC/MS-SIM a unei probe de lapte pentru determinarea esterilor ftalici prin USE-HS-SPME-GC/MS.

Metoda propusă permite determinarea multireziduală a 6 esterilor ftalici (DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP și DNOP) în probe de lapte. Metoda folosită la preextracția analiților din probe este ultrasunarea (USE), urmată de concentrarea extractului, apoi distrugerea lipidelor, pentru eliminarea interferențelor matricei, reluarea analiților cu apă, microextracția lor în fază solidă în “headspace”, separarea analiților pe coloană capilară nepolară, identificarea și cuantificarea lor prin spectrometrie de masă în modul SIM, pentru creșterea sensibilității metodei.

RO 129027 B1

1 După recoltare, proba de lapte a fost omogenizată și s-a supus preextracției cu ultra-
sonare. Pentru aceasta, s-a cântărit cu exactitate o masă m la care s-a adăugat un volum
3 V de ciclohexan:diclormetan, 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
5 proba s-a supus extracției 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
7 solid s-a adăugat un volum V de amestec de solvenți ciclohexan:diclormetan, 3:1 (v/v), și s-a
resupus extracției ultrasonice timp de 15...30 min, analog primei extracții. După sonicare,
9 extractul a fost filtrat prin hârtie de filtru, iar reziduul solid a fost spălat succesiv cu câte v_1 ml
amestec de solvent de extracție. Extracțiile au avut loc la temperatura ambiantă. Filtratele
11 obținute s-au reunit într-un flacon sferic și s-au supus evaporării la rotavapor, până la un
volum de 1 ml. Anterior extracției SPME, s-a realizat distrugerea lipidelor, pentru eliminarea
13 acestor interferențe. Pentru aceasta, la volumul obținut de 1 ml s-au adăugat v_2 ml acid
sulfuric 20...40%, s-a agitat flaconul până ce statul organic a fost incolor. Extractul obținut
15 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 extracția HS-SPME, reziduul
17 probei s-a reluat cu v_3 ml apă ultrapură, s-au adăugat m_1 g NaCl, pentru facilitarea volatilizării
analiților, s-a introdus un agitator magnetic pentru omogenizarea amestecului, apoi flaconul
19 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-
21 100 μ m s-a introdus în spațiul de deasupra probei (în "headspace"), iar extracția s-a efectuat
timp de 70...90 min. Analog s-a preparat o probă blanc a reactivilor. Analiza probei s-a
23 efectuat prin GC-MS.

Analiza gaz cromatografică a celor 6 esteri ftalici s-a efectuat prin injectarea fibrei în
25 inlet-ul gaz cromatografului, în modul „splitless”, menținut izoterm la 280°C, timpul de
desorbție fiind de 10 min. Coloana capilară nepolară utilizată a fost de tip HP-5MS, 30 m x
27 0,25 mm x 0,25 μ m. Gazul purtător He a fost de înaltă puritate, cu un debit de 1 ml/min.
Programul aplicat pentru temperatura coloanei în GC a fost următorul: temperatura inițială
29 este de 100°C, de la 100 la 260°C, cu o rampă de 8°C/min; de la 260 la 310°C, cu o rampă
de 35°C/min și menținută la 310°C pentru 10 min. Operarea spectrometrului de masă s-a
31 efectuat în modul SIM pentru cei 6 analiți, pentru fiecare dintre aceștia alegându-se ionii de
identificare și cuantificare specifici. Au fost monitorizați următorii ioni: 77, 91, 149, 150, 163,
33 167, 177, 279.

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

39 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:

- 41
- limitele de cuantificare pentru cei 6 analiți variază în intervalul 0,62...1,95 μ g/kg;
 - gradele de recuperare pentru cei 6 analiți variază în intervalul 95...102%.

RO 129027 B1

Revendicare

1

Metodă de determinare a ftalaților în probe alimentare de lapte prin microextracție în fază solidă în "headspace" și gaz cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă, **caracterizată prin aceea că** presupune determinarea a 6 esteri ftalici, adică dimetil ftalat, dietil ftalat, dibutil ftalat, butilbenzil ftalat, di-(2-etilhexil) ftalat și di-n-octil ftalat, prin extracție ultrasonică, microextracție în fază solidă în "headspace" și gaz cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă, care cuprinde extracția cu ultrasunete a probelor de lapte cu un amestec de solvenți ciclohexan:diclormetan, la temperatura ambiantă, timp de 15...30 min, urmată de evaporarea extractului, apoi de distrugerea acidă a lipidelor, de microextracția în fază solidă a ftalaților de analizat, și determinarea simultană a acestora prin gaz cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă.

3

5

7

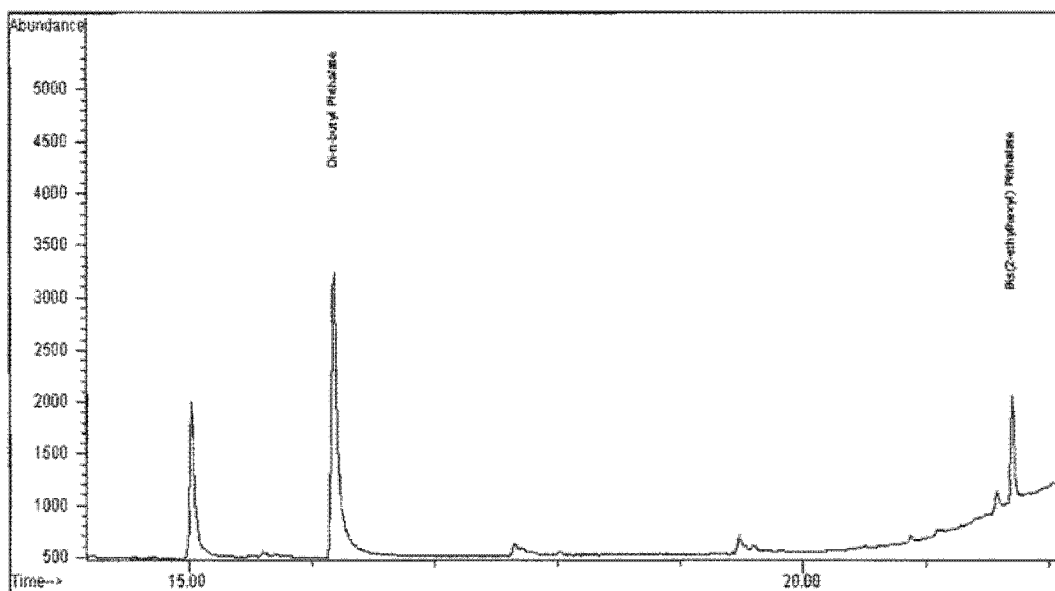
9

11

(51) Int.Cl.

G01N 30/06 (2006.01),

G01N 30/72 (2006.01)



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 439/2016