



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2019 00873

(22) Data de depozit: 06/12/2019

(41) Data publicării cererii:
30/08/2021 BOPI nr. 8/2021

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

(72) Inventatori:
• BECZE ANCA, BD.NICOLAE TITULESCU,
NR.16, AP.35, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• ROMAN CECILIA - MARIA,
PIATA ABATOR, BL.B, AP.5,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• BABALAU - FUSS LILIANA VANDA,
STR. MEHEDINȚII, NR.65-67, BL.C7, SC.2,
ET.1, AP.76, CLUJ- NAPOCA, CJ, RO

(54) METODA DE DETERMINARE A ADULTERĂRII ULEIURILOR
PRIN ANALIZA TOCOFEROLILOR UTILIZÂND TEHNICA
DE LICHID CROMATOGRAFIE DE PRESIUNE ÎNALTĂ
CU DETECTOR DE FLUORESCENȚĂ (HPLC -FLD)

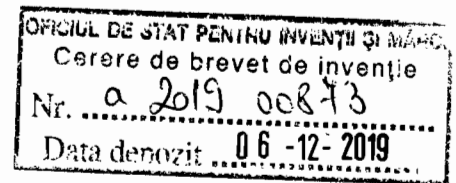
(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de determinare a falsificării uleiurilor alimentare. Metoda, conform invenția constă în prepararea probei de ulei alimentar prin diluare cu izo-propanol 1:100 și filtrare pe cartuș de 45 μm, urmată de analiza a 4 compuși tocoferoli prin tehnica de lichid cromatografie de presiune înaltă cu detector de fluorescență, la lungimi de undă: excitație la 290 nm și

emisie la 330 nm, astfel că profilul de tocoferoli determinat are o corelare de 0,997 cu materia primă din care provine uleiul și procesul tehnologic utilizat pentru obținere acestuia.

Revendicări: 1





DESCRIERE TEHNICA

Prezenta invenție se referă la o **metoda de determinare a adulterării uleiurilor prin analiza tocoferolilor utilizând tehnica de lichid cromatografie de presiune înaltă cu detector de fluorescență (HPLC-FLD)** care asigură depistarea cu o probabilitate de min. 98,31% a adulterărilor uleiurilor.

Prezentarea stadiului tehnicii în momentul actual la nivel internațional. Principală metodă care se aplică la nivel mondial în scopul depistării adulterării uleiurilor alimentare este determinarea profilului acizilor grași prin GC-FID (gaz cromatograf cu detector cu ionizare în flacără) și GC-MS (gaz cromatograf cuplat cu spectrometru de masă). Aceste tehnici sunt folosite pentru depistarea adulterărilor uleiurilor vegetale cum ar fi uleiul de măsline, uleiul de in. [1-7] Pentru a dezvolta o metodă de depistarea a adulterărilor este de asemenea, necesară dezvoltarea unei metodei statistice pe baza rezultatelor obținute la experimentari. Selectivitatea metodei este direct proporțională cu modelul matematic dezvoltat. Pentru determinarea acizilor grași este necesară parcurgerea etapelor de extracție, esterificare și derivatizare a probelor. Aceste etape sunt costisitoare și din punct de vedere al reactivilor dar și din punct de vedere al timpului necesar realizării analizei. De asemenea, datorită diferențelor care pot apărea în mod natural în profilul acizilor grași este imposibilă depistarea adulterărilor la amestecuri realizate în scopul adulterării produsului la procente sub 15 % adăos, ceea ce duce la un grad de predicție foarte scăzut pentru metodele gaz-cromatografice.

Lichid-cromatografia de înaltă performanță sau cromatografia lichidă de înaltă presiune (HPLC) este o metodă cromatografică care se utilizează pentru a separa un amestec de compuși, pentru a identifica, cuantifica sau purifica componentele individuale ale amestecului. HPLC cuplat cu un spectrometru de masă este cel mai des folosit în identificarea adulterărilor uleiurilor vegetale. [8-11] Metodele bazate pe lichid-cromatografie sunt dezvoltate pentru determinarea triacilglicerolului, doar a α -tocoferolului sau a componentelor heterociclice oxigenate.

Prezentarea stadiului tehnicii în momentul actual la nivel național. Pe baza informațiilor din literatura de specialitate deținute, în momentul actual nu există referințe bibliografice privind existența de metode pentru determinarea adulterării uleiurilor prin analiza tocoferolilor utilizând tehnica de lichid cromatografie de presiune înaltă cu detector de fluorescență (HPLC-FLD) în România.

Scopul inventiei: asigurarea unor produse alimentare de inalta calitate sigure pentru sanatatea consumatorului prin depistarea falsificarii uleiurilor folosind profilul de tocoferoli, care are o mare specificitate in functie de materia prima din care uleiul a fost produs

Probleme tehnice pe care prezenta inventie doreste sa le rezolve. Metoda de determinare a adulterarii uleiurilor prin analiza tocoferolilor utilizand tehnica de lichid cromatografie de presiune inalta cu detector de fluorescenta (HPLC-FLD) propusa spre brevetare rezolva urmatoarele probleme:

- Durata mare de analiza pentru depistarea adulterarilor, prin reducerea duratei de analiza la 17 minute;
- Costul de analiza ridicat pentru depistarea adulterarilor; prin eliminarea etapei de extractie sau esterificare care sunt etape necesare si costisitoare in cazul analizei prin gaz cromatografie scazand astfel semnificativ costul de analiza;
- Pierderea analitilor datorita etapelor de manipulare pe care le sufera proba in timpul extractiei (datorita sensibilitatii compusilor la UV), prin simplificarea etapei de preperare a probei care in metoda propusa se compune doar doua etape de preparare probe: dilutie si filtrare;
- Depistarea si a uleiurilor care nu au fost presate la rece dar care nu sunt rezultatul unui proces de rafinare, datorita faptului ca tocoferolii determinati prin metoda propusa sunt foarte sensibili la temperatura, cantitatea acestora injumatatidu-se in ulei odata cu cresterea temperaturii peste 50 °C;
- Determinarea adulterarilor in cazul in care procentul falsificat este sub 15 %, datorita specificitatii ridicate a noii metode propuse de determinare a profilului de tocoferoli (se determina α , β , γ si δ tocoferol); cu metoda propusa spre brevetare se poate determina falsificarea uleiurilor alimentare cu o eficienta a predictiei de minim 98 % deci chiar si in cazul in care falsificarea s-a realizat intr-un procent sub 5 %.

Descriere si avantaje aduse prezenta inventie

Principiul metodei

Determinarea α , β , γ , δ , tocoferolilor din probele de ulei prin separare cromatografica de inalta performanta (HPLC) si urmata de detectie florimetrica.

Prepararea probei

- diluare 1:100 cu iso-propanol;

- filtrare pe cartus de 45 μm .

Parametrii metodei cromatografice

1. Faza mobila, compusa din ♦ Acetonitril 50 %, ♦ Metanol 45 %, H₂O 5 % in procente bine definite
2. Debit: 0.75 ml/min
3. Volum de injectie: 5 μl
4. Temperatura coloanei cromatografice: 30 °C
5. Coloana cromatografica (dimensiuni): 3.0 x 150 mm, 2.7 μm
6. Lungimi de unda: • Excitatie: 290 nm • Emisie: 330 nm

Avantajele aduse de prezenta inventie

- Durata de analiza scurta: 17 minute;
- Prepararea probei se realizeaza rapid si eficient deoarece are doar doua etape componente: diluare si filtrare;
- Se determina un numar de 4 compusi (α , β , γ si δ tocoferol) care ofera specificitate ridicata metodei, profilul acestora avand o corelare de 0,997 cu materia prima din care provine uleiul si procesul tehnologic folosit pentru obtinerea acestuia;
- Costul de analiza scazut, datorita simplitatii metodei atat in etapa de preparare proba cant si in etapa de analiza, ceea ce reduce atata costul cu materialele cat si cu manopera.

Bibliografie

1. Peng, D., Bi, Y., Ren, X., Yang, G., Sun, S., & Wang, X. (2015). Detection and quantification of adulteration of sesame oils with vegetable oils using gas chromatography and multivariate data analysis. *Food Chemistry*, 188, pp. 415-421.
2. Monfreda, M., Gobbi, L., & Grippa, A. (2014). Blends of olive oil and seeds oils: characterisation and olive oil quantification using fatty acids composition and chemometric tools. Part II, *Food Chemistry*, 145, pp. 584-592.
3. Zhang, L. X., Li, P. W., Sun, X. M., Wang, X. F., Xu, B. C., Wang, W. P., et al. (2014). Classification and adulteration detection of vegetable oils based on fatty acid profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, pp. 8745-8751.
4. Woodbury, Simon & Evershed, Richard & Barry. Rossell, J & E. Griffith, Rosemary & Farnell, Peter. (1995). Detection of Vegetable Oil Adulteration Using Gas Chromatography Combustion/Isotope Ratio Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry - ANAL CHEM*. 67. 2685-2690. <http://dx.doi.org/10.1021/ac00111a029>.

5. Monfreda, M., Gobbi, L., & Grippa, A. (2014). Blends of olive oil and seeds oils: characterisation and olive oil quantification using fatty acids composition and chemometric tools. Part II, *Food Chemistry*, 145, pp. 584-592.
6. Mümtaz, F., Diraman, H., & Oezdemir, D. (2013). Classification of Turkish Monocultivar (Ayvalık and Memecik cv.) Virgin olive oils from north and south zones of Aegean region based on their triacylglycerol profiles. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90, pp. 1661-1671.
7. Sun X., Liangxiao Zhang, Peiwu Li, Baocheng Xu, Fei Ma, Qi Zhang, Wen Zhang, (2015), Fatty acid profiles based adulteration detection for flaxseed oil by gas chromatography mass spectrometry, *LWT - Food Science and Technology* 63, pp. 430-436.
8. Fasciotti M., Pereira Netto A. D., (2010), Optimization and application of methods of triacylglycerol evaluation for characterization of olive oil adulteration by soybean oil with HPLC-APCI-MS-MS, *Talanta* 81(3), pp 1116-1125, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.02.006>.
9. M.J. Lerma-García, R. Lusardi, E. Chiavaro, L. Cerretani, A. Bendini, G. Ramis-Ramos, E.F. Simó-Alfonso, (2011), Use of triacylglycerol profiles established by high performance liquid chromatography with ultraviolet-visible detection to predict the botanical origin of vegetable oils, *Journal of Chromatography A* 1218 (42), pp. 7521-7527, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.07.078>.
10. Bakre S. M., Gadmale D. K., Toche R. B., and Gaikwad V. B. (2015) Rapid determination of alpha tocopherol in olive oil adulterated with sunflower oil by reversed phase high-performance liquid chromatography, *J Food Sci Technol*. 52 (5), pp. 3093-3098.
11. Hao Fan, Qingli Wu, James E. Simon, Shyi-Neng Lou, Chi-Tang Ho, (2015) Authenticity analysis of citrus essential oils by HPLC-UV-MS on oxygenated heterocyclic components, *Journal of Food and Drug Analysis*, 23 (1), pp. 30-39, <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.05.008>.

REVENDICARI

Metoda de determinare a adulterarii uleiurilor prin analiza tocoferolilor utilizand tehnica de lichid cromatografie de presiune inalta cu detector de fluorescenta (HPLC-FLD) **caracterizata prin aceea ca** utilizeaza profilul de tocoferoli (α , β , γ si δ tocoferol) pentru depistarea adulterarii uleiurilor, la lungimi de unda ale detectorului de fluorescenta: excitatie la 290 nm si emisie la 330 nm si etapa de prepararea a probei este compusa din doua operatii: diluare 1:100 cu iso-propanol si filtrare pe cartus de 45 μ m.