



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2020 00466

(22) Data de depozit: 30/07/2020

(41) Data publicării cererii:
28/01/2022 BOPI nr. 1/2022

(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,
PIAȚA 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 LAPTELUI
ȘI PRODUSELOR LACTATE PRIN ANALIZA BETA
CAROTENULUI UTILIZÂND TEHNICA DE LICHID
CROMATOGRAFIE DE PRESIUNE ÎNALTĂ CU DETECTOR
DE UV (HPLC -UV)

(57) Rezumat:

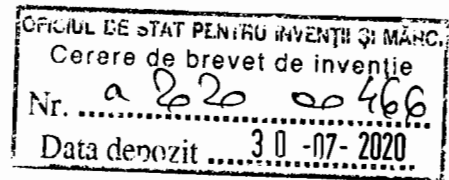
Invenția se referă la o metodă de determinare a adulterării laptelui și a produselor lactate prin analiza β -carotenului utilizând tehnica de lichid cromatografic de presiune înaltă cu detector UV (HPLC - UV) care asigură depistarea cu o probabilitate de minim 97,4% a adulterărilor din lapte și produse lactate în vederea protejării consumatorilor. Metoda conform invenției are o durată de analiză scurtă de 12 minute și constă în analizarea β -carotenului din probele de lapte și produse lactate prin separare cromatografică de înaltă performanță (HPLC) urmată de detecție UV și constă în prepararea unui probe prin cântărirea a 5 grame de probă cu o precizie de 0,01g, saponificare cu o soluție alcoolică de KOH 25% timp de 30 minute pe baie de ultrasunete la o temperatură de 40°C în prezența acidului ascorbic utilizat ca antioxidant, extracția soluției de

saponificare cu 5 ml hexan: acetat de etil (70:30), centrifugare și colectarea fazei organice, a doua etapă de extracție a soluției de saponificare cu 5 ml hexan: acetat de etil (70:30), centrifugare și colectare fază organică, evaporarea fazei organice colectată la sec la rotavapor și reducere cu 1 ml fază mobilă și injectare în lichid cromatograf a fazei organice colectată la sec readusă în faza mobilă, faza mobilă fiind compusă din 30% acetoneitril, metanol + acetat de amoniu 3.2g/l 70%, cu un debit de 1 ml/minut, cu un volum de injecție de 5 μ l, cu temperatura coloanei cromatografice de 40°C, cu lungimea de undă de 460 nm și dimensiunile coloanei cromatografice de 120mm, EC - C 18,3 0 x 150 mm, 2,7 um.

Revendicări: 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 invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).





DESCRIERE TEHNICA

Prezenta invenție se referă la o **metoda de determinare a adulterării laptelui și produselor lactate prin analiza beta carotenului utilizând tehnica de lichid cromatografie de presiune înaltă cu detector de UV (HPLC-UV)** care asigură depistarea cu o probabilitate de min. 97.4 % a adulterărilor laptelui și produselor lactate.

Prezentarea stadiului tehnicii în momentul actual la nivel internațional. Adulterarea laptelui și a produselor lactate a intrat în atenție la nivel mondial după descoperirea contaminării cu melamina a produselor lactate din China din 2008. Cu toate acestea, istoria adulterării laptelui este foarte veche. În 1850 a fost raportat un scandal care implică adulterarea laptelui și care a avut ca și consecință moartea a 8000 de copii doar în New York. Laptele este considerat a fi „alimentul ideal” datorită nutrienților abundenti necesari atât sugariilor cât și de adulți. Este una dintre cele mai bune surse de proteine, grăsimi, carbohidrați, vitamine și minerale. Din păcate, laptele este foarte ușor adulterat în întreaga lume. Motivele posibile din spatele acestuia pot include diferența de cerere și ofertă, natura perisabilă a laptelui, capacitatea scăzută de cumpărare a clientului și lipsa unor teste de detectare adecvate. Motivatia pentru fraudă alimentară este economică, dar impactul este o problemă reală de sănătate publică [1-3]

Testele de control al calității laptelui sunt foarte importante pentru a asigura consumatorii că laptele nu a fost adulterat. Adulterarea laptelui reduce calitatea laptelui și îl poate face chiar periculos pentru consum. Sunt multe moduri de adulterare a laptelui cele mai comune sunt: [1, 4, 5]

- Adăos de apă;
- Adăos de lapte degresat;
- Adăugarea agenților de îngroșare atunci când laptele este degresat, deoarece scăderea densității și a vâscozității poate fi compensată prin adăugarea de substanțe precum gelatina, zahărul din trestie, amidon, glucoză;
- Degresarea parțială a laptelui.
- Adăugarea de coloranți pentru a restabili culoarea pierdută prin degresare sau diluare;

- Alt tip de adulterare avand ca scop creșterea duratei de conservare a laptelui, consta in adaugarea de substante chimice cum ar fi: uree, sulfat de amoniu, apa oxigenata, etc.

Produsele lactate sunt de asemenea, adulterate prin diferite tehnici:

- adaugarea de amidon;
- utilizarea altor materii prime decat cele trecute pe eticheta (lapte de vaca cand de fapt se foloseste ulei vegetal, lapte de oaie/capra/bivolita cand de fapt se utilizeaza lapte de vaca);
- folosirea colorantilor si aromatizantilor fara trecerea acestora pe eticheta: pentru a induce consumatorului iluzia ca produsul este afumat, maturat, ca laptele utilizat a fost de un anumit tip/calitate etc.;
- declararea falsa a produsului ca dint-o anumita zona sau ca fiind fabricat in anumite conditii. [2]

Multe din adulterarile laptelui prezentate pot fi depistate cu usurinta utilizand tehnici analitice banale, in special reactii de culoare, dar sunt foarte dificil de analizat adulterarile produselor lactate, cum ar fi branza, in care eticheta de produs nu corespunde cu materiile prime, tehnicile de fabricatie sau zona de provenienta. Pentru depistarea acestor adulterari sunt necesare tehnici analitice superioare si baze de date formate care sa asigure o certitudine de minim 95% a rezultatelor. [1]

Prezentarea stadiului tehnicii in momentul actual la nivel national. Pe baza informatiilor din literatura de specialitate detinute, in momentul actual nu exista referinte bibliografice privind existenta de metode pentru determinarea adulterarii laptelui si a produselor lactate prin analiza beta carotenului utilizand tehnica de lichid cromatografie de presiune inalta cu detector de UV (HPLC-UV) in Romania.

Scopul inventiei: asigurarea unor produse alimentare de inalta calitate sigure pentru sanatatea consumatorului prin depistarea falsificarii laptelui si a produselor lactate, prin determinarea beta-carotenului, care are o mare specificitate in functie de specia si conditiile de furajare a animalului de la care provine.

Probleme tehnice pe care prezenta inventie doreste sa le rezolve. Metoda de determinare a adulterarii laptelui si a produselor lactate prin determinarea beta-carotenului



utilizand tehnica de lichid cromatografie de presiune inalta cu detector de UV (HPLC-UV) propusa spre brevetare rezolva urmatoarele probleme:

- Durata mare de analiza pentru depistarea adulterarilor, prin reducerea duratei de analiza la 12 minute;
- 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;
- Permite depistarea colorantilor sintetici din lapte si produse lactate;
- Permite depistarea tipului de furajare folosit pentru bovine;
- Permite depistarea usoara a adulterarii laptelui de capra, bivolita cu lapte de vaca.

Descriere si avantaje aduse prezenta inventie

Principiul metodei

- Determinarea β -carotenului din probele de lapte si produse lactate, prin separare cromatografica de inalta performanta (HPLC) si urmata de detectie UV.

Prepararea probei

1. Cantarire 5 g de proba cu o precizie de 0.01g
2. Saponificare cu o solutie alcoolica de KOH 25 % timp de 30 de minute pe baie de ultrasunete, la 40 °C in prezenta de acid ascorbic utilizat ca antioxidant;
3. Extractia solutiei saponificate cu 5 ml hexan : acetat de etil (70:30);
4. Centrifugare si colectare faza organica;
5. Extractia nr. 2 a solutiei saponificate cu 5 ml hexan : acetat de etil (70:30);
6. Centrifugare si colectare faza organica;
7. Evaporare faza organica colectata la sec la rotavapor si readucere cu 1 ml faza mobila.
8. Injectare in lichid cromtograf a fazei organice colectata la sec readusa in faza mobila

Parametrii metodei cromatografice (parametrii de lucru)

1. Faza mobila, compusa din ♦Acetonitril 30 %, ♦Metanol + acetat de amoniu 3.2 g/l 70 %,

2. Debit: 1 ml/min
3. Volum de injectie: 5 μ l
4. Temperatura coloanei cromatografice: 40 °C
5. Coloana cromatografica (dimensiuni): 120 mm, EC-C18, 3.0x150mm,2.7 μ m
6. Lungimi de unda: 460 nm

Avantajele aduse de prezenta inventie

- Durata de analiza scurta: 12 minute;
- Determinarea unui singur compus permite realizarea unui tablou larg asupra caracteristicilor si calitatii laptelui si produselor lactate;;
- 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. Azad, T., Ahmed, S. Common milk adulteration and their detection techniques. Food Contamination 3, 22 (2016). <https://doi.org/10.1186/s40550-016-0045-3>
2. https://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/show.do?dataset=apro_mk_pobta&lang=en, accesat la data de 30.05.2020;
3. Domenico Montesano, Oriella Gennari, Carmen Festa, Franco Zollo, Serenella Seccia and Stefania Albrizio, A Simple HPLC-DAD Method for the Analysis of Melamine in Protein Supplements: Validation Using the Accuracy Profiles, Journal of Chemistry, Volume 2013 <https://doi.org/10.1155/2013/239342>
4. https://www.perkinelmer.com/pdfs/Downloads/APP_MilkAdulterationDetectingSpeciesProteins.pdf accesat la data de 30.05.2020;
5. Rajan Sharma Yudhishthir Rajput POONAM Estimation of sugars in milk by HPLC and its application in detection of adulteration of milk with soymilk, November 2009, International Journal of Dairy Technology 62(4):514 – 519, DOI: 10.1111/j.1471-0307.2009.00532.x

REVENDICĂRI

Metoda de determinare a adulterării laptelui și produselor lactate prin analiză beta carotenului utilizând tehnica de lichid cromatografie de presiune înaltă cu detector de UV (HPLC-UV) **caracterizată prin aceea că** utilizează beta carotenul pentru depistarea adulterării laptelui și produselor lactate, la lungimea de undă ale detectorului de UV 460 nm și etapa de preparare a probei este compusă din două operații: saponificare și extracție.