



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2018 00528**

(22) Data de depozit: **13/07/2018**

(41) Data publicării cererii:
30/01/2020 BOPI nr. 1/2020

(71) Solicitant:
• **CENTRUL DE MEDIU ȘI SĂNĂTATE
S.R.L., STR.BUSUIOCULUI, NR.58,
CLUJ- NAPOCA, CJ, RO**

(72) Inventatori:
• **DUMITRAȘCU IRINA, STR. URUȘAGULUI
NR.111C, ET.1, AP.10, FLOREȘTI, CJ, RO;**
• **GURZĂU ANCA ELENA, STR. CETĂȚII
NR. 25A, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **MICU ROMEO, STR.ROSETTI, NR.12-14,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO**

(54) **METODA GAZCROMATOGRFICĂ
PENTRU DETERMINAREA FTALAȚILOR
ȘI A METABOLIȚILOR LOR DIN LICHIDUL FOLICULAR
AL PACIENTELOR CARE URMEAZĂ TRATAMENTE
DE REPRODUCERE ASISTATĂ**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de determinare a ftalaților și metaboliților acestora din lichidul folicular al pacientelor care urmează tratamente de reproducere asistată. Metoda, conform invenției, constă în recoltarea lichidului folicular, transvazarea în plăci Petri din polistiren, și transportul probelor conservate în container izoterm la temperatura de 1...4°C, la analiză, într-un timp de maximum 2 h de la recoltare, pentru minimizarea contaminării cu ftalați, urmată de extracția

acestora în fază solidă în maximum 24 h de la recoltarea lichidului folicular, separarea prin cromatografie în fază gazoasă cu folosirea coloanelor capilare, urmată de identificarea și cuantificarea ftalaților prin spectrometrie de masă, metoda permițând minimizarea expunerii la ftalați a fluidului biologic, care constituie un factor de risc al procedurii de fertilizare *in vitro*.

Revendicări: 2



METODA GAZCROMATOGRAFICĂ PENTRU DETERMINAREA FTALAȚILOR ȘI METABOLIȚILOR LOR DIN LICHIDUL FOLICULAR AL PACIENTELOR CARE URMEAZĂ TRATAMENTE DE REPRODUCERE ASISTATĂ

Descriere

Studiile experimentale in vivo și in vitro, și în același timp studii umane sugerează că poluanții din mediu joacă un rol important în infertilitatea feminină de cauză necunoscută. Datorită prezenței ubicuitare, a expunerii frecvente și a dovezilor experimentale semnificative ca disruptori endocrini, preocuparea pentru diesteri ftalați, bisfenolul A și benzofenonele ca factori de risc pentru infertilitatea feminină este în creștere (Fujimoto&Bloom, 2015). Cunoscuți ca disruptori endocrini, efectele ftalaților (PHT) au fost deja raportate asupra foliculogenezei și dezvoltării ovocitului (Yao et al, 2016), chiar și nivelele foarte scăzute de metaboliți ai ftalaților trebuind să fie luate în considerare în evaluarea de risc (Kallo&Roth, 2016). În cazul evaluării funcției reproductive, inclusiv în cazul procedurii de fertilizare in vitro, un număr de studii au vizat determinarea unor xenobiotice din lichidul seminal și lichidul folicular, ca biomarkeri de expunere ce pot avea implicații în studiile clinice și epidemiologice (Bloom et al, 2015). Se știe că există un transfer sau o acumulare a PHT în fază preovulatorie a ovocitului în cursul tratamentelor pentru infertilitate urmate de femei, iar această concentrație a putut fi invers asociată cu succesul procedurilor de reproducere umană asistată (Hauser et al, 2016). Puține studii au determinat metaboliți ai ftalaților din lichid folicular. Echipamentele și metodele moderne de analiză chimică (cromatografia de gaze, cromatografia de lichide, cromatografia de lichide de înaltă performanță, cromatografie electrocinetică micelară) au creat posibilitatea ca studiul cauzelor infertilității feminine idiopatice să se concentreze asupra unor nivele foarte scăzute de expunere la poluanți organici non persistenți (Yao et al, 2016).

Imposibilitatea de diagnosticare în România a infertilității feminine de cauză idiopatică în urma expunerii ubicuitare la poluanți organici impune dezvoltarea și implementarea unei metode de analiză a ftalaților și metaboliților (MPHT) lor din lichid folicular (LF) în cadrul procedurii de fertilizare in vitro (FIV).

S-au abordat modalitățile de transfer, transport, conservare și analiză din LF a patru PHT (permit identificarea și a contaminării în timpul procedurii de recoltare, transport și conservare până la momentul analizei) și a metaboliților lor (permit identificarea expunerii recente, în intervalul de maximum 48 de ore înaintea procedurii de recoltare a conținutului folicular).

Procedura de recoltare a aspiratului folicular și apoi izolarea ovocitului presupune un interval de timp în care fluidul biologic vine în contact cu teflon și materiale plastice (polystyrene/ polypropylene). În plus, datorită transformării rapide a ftalaților în mediul extern accelerată de lumina și temperatura crescută, a posibilității de contaminare în timpul recoltării și post recoltare, etapele intermediare de la momentul recoltării ovulului și obținerea LF și până la momentul analizării acestuia în laborator sunt esențiale în obținerea unor rezultate de înaltă acuratețe.

Obiective propuse: 1- Realizarea și testarea modelului experimental de recoltare, conservare și transport a LF în procedeul de FIV până la analiză; 2-Optimizarea metodei de analiză GC a PHT prin extinderea matricilor analizate la LF.

Aspectul inovativ al proiectului: se elaborează în premieră pentru România o procedură nouă de diagnostic a factorului de risc "expunerea la PHT" care poate influența procedeul de FIV. Cercetarea documentară nu a relevat existența unei astfel



de metode în România, iar pe plan internațional, cercetările în domeniu sunt în stadiu de testări.

Studiul s-a desfășurat pe un lot de 25 paciente care au urmat tratamente de reproducere asistată (fertilizare in vitro) la centrul de specialitate din Cluj- Napoca.

Protocolul de studiu a constatat în: obținerea consimțământului informat, recoltarea conținutului folicular, separarea ovocitelor și a lichidului folicular, repartizarea lichidului folicular în câte 2 eprubete din 2 materiale diferite (polistiren și sticlă) pentru fiecare pacienta (au rezultat 100 probe), transportul la laborator, analizarea probelor de lichid folicular la 2 și 48 ore de la recoltare, interpretarea rezultatelor.

S-a urmărit analiza a patru PHT cu metaboliții lor:

Di(2-etilhexil)ftalat – DEHP cu metaboliții mono(2-etilhexil)ftalat (MEHP), mono(2-etil-5-oxohexil)ftalat (5oxo-MEHP) și mono (2-etil-5-hidroxihexil)ftalat (5OH-MEHP);

Benzil butil ftalat - BzBP- cu metabolitul mono benzil butil ftalat -MBzBP

Dibutil ftalat –DBP cu metabolitul monobutil ftalat –MBP

Diisobutil ftalat-DiBP cu metabolitul mono iso butil ftalat-MiBP.

Rezultatele au evidențiat următoarele: Trei ftalați au fost identificați în probele analizate (Di(2-etilhexil)ftalat – DEHP , Dibutil ftalat –DBP și Diisobutil ftalat -DiBP), concentrațiile acestora înregistrând o mare variabilitate individuală, dar și în funcție de parametrii de recoltare și momentul analizei. Concentrația benzil butil ftalatului - BzBP- a fost în toate probele analizate sub limita de detecție a metodei ($<0,2 \mu\text{g/l}$), indiferent de tipul eprubetei în care a fost recoltată proba sau timpul de stocare până la analiză. În ansamblu, indiferent de condițiile de recoltare sau momentul analizei LF, ordinea descrescătoare a concentrațiilor mediane măsurate au fost pentru DBP, DEHP, DiBP. Însursumarea concentrațiilor mediane ale ftalaților identificați a evidențiat o creștere substanțială a concentrației totale în probele recoltate în eprubete de polistiren păstrate 48 h la frigider înainte de analiză și mai puțin semnificativă în cazul eprubetelor de sticlă. Dacă în cazul probelor recoltate și păstrate în eprubete de plastic față de cele de sticlă rata de creștere a fost nesemnificativă la 2 ore (12%) față de cea la 48 h în eprubetele de plastic când augmentarea concentrației totale a ftalaților identificați a fost de 39 %.

Au existat totuși situații în care concentrațiile măsurate la 48 h în eprubetele de sticlă au fost mai mari decât la 2 h sau invers în cazul probelor recoltate în eprubete de plastic. Cu toate acestea rezultatele au arătat că independent de variabilitatea individuală și/sau în timp a concentrațiilor de ftalați, aceștia pot fi măsurați în lichidul folicular (marker de contaminare secundară procedurii de recoltare a conținutului folicular), modalitățile de recoltare și păstrare până la momentul analizei le influențează direct. Momentul optim de analiză este la 2 ore de la recoltare.

Indiferent de materialul eprubetei și de timpul de păstrare până la analiză, 5-OH-MEHP, metabolitul secundar al DEHP a fost identificat în toate probele de LF analizate, spre deosebire de 5-oxo-MEHP, metabolitul terțiar al DEHP care a fost identificat în proporție mai mică (96%) la 48 h de la recoltarea LF, în eprubeta de sticlă și la 2h în cea de polistiren. O mențiune aparte trebuie făcută pentru MBzP care a fost identificat în proporție foarte mare (96-100%), chiar dacă BzBP nu a fost identificat peste limita de detecție a metodei în nici o probă. În ordine descrescătoare, MBP și MEHP (metabolit primar al DEHP) au fost identificați în proporții mai mici. În ansamblu, frecvența de detectare a fost mai mare sau egală la 48 h pentru probele păstrate în eprubetă de polistiren, cu excepția MBP. În cazul probelor păstrate în eprubete de sticlă frecvența de detectare a fost mai mică sau egală pentru toți metaboliții analizați.



În ceea ce privește concentrația metaboliților, la fel ca și în cazul flataților părinți, a existat o mare variabilitate individuală, la fel ca și legată de materialul eprubetei și timpul de păstrare. Cele mai mari concentrații mediene ale metaboliților, în ordine descrescătoare, în cazul probelor păstrate în ambele tipuri de eprubete au fost cele ale MEHP, 5-oxo-MEHP, MBP, 5-OH-MEHP și MBzP. La 48 de ore de la recoltarea LF concentrațiile mediene ale metaboliților sunt similare cu excepția MBP care scade, atât în eprubetele de sticlă cât și în cele de plastic.

Trebuie menționat faptul că deși DBP a avut cele mai mari concentrații mediane în LF, metabolitul acestuia s-a situat ca nivel de concentrație mediană sub metaboliții primar și terțiar ai DEHP. Rezultă importanța determinării metaboliților din punct de vedere al impactului toxicologic, DEHP fiind cunoscut ca singurul cancerigen din grupa acestor compuși chimici care toți acționează ca disruptori endocrini.

Momentul optim de analiză pentru metaboliți este de 2 ore de la recoltare.

Metoda propusă de recoltare/transport /păstrare a lichidului folicular.

Acul folosit pentru puncție - steril, cu vârf tăios (V-Tip™) din oțel inoxidabil, marcat pentru ecoghidaaj la vârf, atașat la tubulatura fabricată din Teflon conectată la sistemul de spălare și la eprubeta – sticlă borosilică, refolosibilă, pentru colectarea aspiratului folicular. Fiecare eprubetă se acoperă cu folie de aluminiu spălată în prealabil cu acetonă după care se fixează dopul.

Odată recoltat, aspiratul folicular va fi transvazat în plăci Petri din polistiren minimizându-se timpul de contact al LF cu acestea.

Transportul probelor la laborator se face în container izoterm, la temperatura de 1-4°C, în maximum 2 ore de la recoltare.

Metoda de analiză gascromatografică a flataților din lichid folicular

Metoda presupune extracția compușilor din lichid prin extracție în fază solidă (SPE), separarea acestora prin cromatografie în fază gazoasă, cu folosirea coloanelor capilare, urmată de identificarea și cuantificarea flataților prin spectrometrie de masă. Metoda de analiză a flataților din lichid folicular a fost adaptată după metoda de analiză a flataților din apă (EN ISO 18856:2006).

Toate soluțiile standard se prepară în sticlărie de laborator, care a fost încălzită la 200°C timp de trei ore, spălată cu acetonă și uscată.

Cartușele de SPE umplute cu material de divinilbenzen polistiren poros (Thermo Scientific, USA), de 6 ml, modificat cu grupări funcționale ureice, se preconditionează astfel:

- ✓ se spală cu un volum de coloană de acetat de etil;
- ✓ se usucă la vid maxim 10 s;
- ✓ se spală cu două volume de coloană de metanol;
- ✓ se închide robinetul când stratul de lichid atinge stratul de solid.

Se trec prin coloană 2,0 ml probă la un debit de o picătură/secundă, se spală cu două volume de coloană de apă distilată, se usucă cartușul la vid timp de 30 secunde, se adaugă 1 ml acetat de etil, se lasă în repaus 10 secunde, se eluează compușii la un debit de o picătură/secundă și se creează vid pentru colectarea probei. Se transferă proba într-un vial de analiză cu volumul de 1,5 ml și se analizează prin cromatografie în fază gazoasă.

Probele au fost acoperite în permanență cu folie de aluminiu spălată cu acetonă.

Metoda de analiză gascromatografică a metaboliților flataților din lichid folicular

Metoda de evaluare a concentrației metaboliților flataților în lichid folicular presupune incubarea enzimatică, derivatizarea și cuantificarea acestora prin cromatografie în fază gazoasă.



Plecând de la dotările analitice actuale ale laboratorului s-a optat pentru derivatizarea compușilor după hidroliza enzimatică urmată de analiza prin cromatografie în fază gazoasă. Pentru o cuantificare cât mai exactă se folosește metoda diluției cu standard intern (adăugarea de cantități cunoscute din substanțe cu proprietăți similare, în cazul nostru se folosesc aceeași metaboliți marcați cu atomi de deuteriu sau carbon 13).

Toate soluțiile standard se prepară în sticlărie de laborator, care a fost încălzită la 200°C timp de trei ore, spălată cu acetonă și uscată.

După încercări efectuate pe probe de lichid folicular s-a decis folosirea metodei pentru analiza metaboliților din urină după (Kim et al, 2014) adaptată la echipamentele noastre, cu mici modificări privind acidifierea probei și a timpului de incubare.

Peste 2 ml de probă de lichid folicular transferată într-un tub de sticlă borosilică se adaugă 500 μl acid fosforic, 700 μl acetat de amoniu 1M și se omogenizează proba prin agitare pe vortex 30 secunde. Se adaugă 100 μl standard intern și 100 μl enzimă β-glucuronidază în fiecare probă pentru a deconjugă metaboliții ftalaților glucuronidați (Silva et al., 2004). Probele se acoperă cu folie de aluminiu (spălată cu acetonă și uscată), se agită ușor și se țin la incubat la 37°C într-o baie de apă închisă timp de 2,5 ore.

Dupa hidroliza enzimatică se adaugă 5 ml solvent de extracție la fiecare probă și se ultrasonează timp de 30 minute.

Cu o pipeta Pasteur se înlătură faza apoasă, se adaugă 2 g sulfat de sodiu anhidru și se transferă faza organică într-o fiolă de evaporare. Se spală sulfatul de sodiu cu 1 ml solvent de extracție și se evaporă la sec sub un curent slab de azot la o temperatură de 45°C.

Se adaugă 100 μl agent de derivatizare - N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide cu 1% trimethylchlorosilane (BSTFA cu 1%TMCS) și 0,9 ml acetat de etil la fiecare probă. Se acoperă fiolele cu folie de aluminiu și se lasă în termoreactor la 65°C timp de 1 h. Se transvazează probele în vialuri de 1,5 ml, se acoperă cu folie de aluminiu înainte de a pune capacul vialului și se analizează pe GC-MS.

Analiza se realizează cu ajutorul unui cromatograf de gaze (GC Shimadzu-2010) cuplat cu un spectrometru de masă (Shimadzu QP 2010) și un autosampler (AOC 20i+s, Shimadzu Corporation). Compușii sunt separați pe o coloană capilară TraceGold TG-5MS, 5% difenil-95% dimetilpolisiloxan (lungime 30m, diametru interior 0,25mm, grosimea filmului 0,25mm).

Spectrele de masă se obțin prin fragmentarea compușilor cu ionizare electronică de impact (70 eV). Pentru a evalua modul de fragmentare spectrală al fiecărui compus, o soluție standard (1 μg/mL) a fost analizată prin GC-MS în modul scanare totală pentru fiecare compus, pentru care ionii țintă (vârfuri de bază) și de calificare au fost aleși pentru a atinge cel mai bun răspuns în modul de achiziție SIM (Dumitrașcu, 2013).

Curba de calibrare a metodei a fost efectuată în cinci puncte în domeniul 2,5-250 nanograme / mililitru pentru fiecare compus.

Referințe:

1. Bloom M.S. et al (2015) Associations between urinary phthalate concentrations and semen quality parameters in a general population, Hum Reprod. 30 (11):2645-57.
2. Dumitrascu I, Gurzau AE, Gurzau ES (2015) A pilot study on determination of phthalates from drinking water system supply of Cluj-Napoca by solid phase extraction and GC-MS analysis, Wulfenia Journal, Vol 22, No. 4; 345-358
3. Fujimoto Y., Bloom M.S. (2015) Role of Environmental Factors and Gonadotoxin Exposure in Unexplained Female Infertility, Chapter - In book: Unexplained Infertility: Pathophysiology, Evaluation and Treatment, Edition: 1, Chapter: 15, Publisher: Springer-Verlag, p.161-173.

4. Hauser R et al (2016) Urinary Phthalate Metabolite Concentrations and Reproductive Outcomes among Women Undergoing in Vitro Fertilization: Results from the EARTH Study. *Environ Health Perspect.* 124(6):831-9.
5. Kalo D, Roth Z. (2016) Low level of mono(2-ethylhexyl) phthalate reduces oocyte developmental competence in association with impaired gene expression. *Toxicology*; 377:38-48. doi: 10.1016/j.tox.2016.12.005.
6. Kim M, Song NR, Choi JH, Lee J, Pyo H. (2013) Simultaneous analysis of urinary phthalate metabolites of residents in Korea using isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. *Sci Total Environ.* 2014 Feb 1;470-471:1408-13. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.07.037. Epub 2013 Aug 5.
7. Silva M.J., Slakman A.R., Reidy J. A., Preau J.L.Jr., Herbert A.R., Samandar E., Needham L.L, Calafat A.M, (2004), Analysis of human urine for fifteen phthalate metabolites using automated solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B* 805, 161–167.
8. Yao-Yao Du, Yue-Li Fang, Yi-Xin Wang, Qiang Zeng, Na Guo, Hua Zhao, Yu-Feng Li (2016) Follicular fluid and urinary concentrations of phthalate metabolites among infertile women and associations with in vitro fertilization parameters. *Reprod Toxicol* 61, 142–150.

REVENDICĂRI

1) Model experimental de recoltare, conservare și transport al lichidului folicular rezultat în urma tratamentelor de reproducere asistată (fertilizare in vitro). Modelul experimental este caracterizat prin faptul că stabilește momentul și condițiile optime în vederea minimalizării/excluderii contaminării cu ftalați în timpul procedurii de recoltare, transport și conservare până la momentul propice al efectuării analizei. Metoda propusă de recoltare/transport și păstrare a lichidului folicular presupune folosirea acului pentru puncție steril, cu vârf tăios (V-Tip™) din oțel inoxidabil, marcat pentru ecoghidaj la vârf, atașat la tubulatura fabricată din Teflon, conectat la sistemul de spălare și la eprubeta din sticla borosilică, refolosibilă, pentru colectarea aspiratului folicular. Fiecare eprubetă se acoperă cu folie de aluminiu spălată în prealabil cu acetonă, după care se fixează dopul. Odată recoltat, aspiratul folicular va fi transvazat în plăci Petri din polistiren minimizându-se timpul de contact al lichidului folicular cu acestea. Pentru analiza ftalaților și a metaboliților acestora, transportul și păstrarea probelor se face în eprubetele de sticlă borosilică, care se acoperă cu folie de aluminiu spălată în prealabil cu acetonă. Transportul la laborator se face în container izoterm, la temperatura de 1-4°C, în maxim 2 ore de la recoltare, iar prepararea probelor în laborator se face în recipiente de sticlă, extracția făcându-se în maxim 24 ore de la recoltarea lichidului folicular.

2) Metoda inovativă de analiză gaz cromatografică a ftalaților și metaboliților acestora din lichidului folicular (matrice specifică), metoda care permite evaluarea complexă a factorilor de risc pentru fertilizarea in vitro și care poate fi extinsă și la alți compuși semivolatili. Metoda de analiză gazcromatografică a ftalaților din lichid folicular presupune extracția compușilor din lichid prin extracție în fază solidă (SPE), separarea acestora prin cromatografie în fază gazoasă, cu folosirea coloanelor capilare urmată de identificarea și cuantificarea ftalaților prin spectrometrie de masă. Toate soluțiile standard se prepară în sticlărie de laborator, care a fost încălzită la 200°C timp de trei ore, spălată cu acetonă și uscată. Cartușele de SPE umplute cu material de divinilbenzen polistiren poros (Thermo Scientific, USA), de 6 ml, modificat cu grupări funcționale ureice, se preconditionează astfel:

- ✓ se spală cu un volum de coloană de acetat de etil;
- ✓ se usucă la vid maxim 10 s;
- ✓ se spală cu două volume de coloană de metanol;
- ✓ se închide robinetul când stratul de lichid atinge stratul de solid.

Se trec prin coloană 2,0 ml probă la un debit de o picătură/secundă, se spală cu două volume de coloană de apă distilată, se usucă cartușul la vid timp de 30 secunde, se adaugă 1 ml acetat de etil, se lasă în repaus 10 secunde, se eluează compușii la un debit de o picătură/secundă și se creează vid pentru colectarea probei. Se transferă proba într-un vial de analiză cu volumul de 1,5 ml și se analizează prin cromatografie în fază gazoasă. Probele au fost acoperite în permanență cu folie de aluminiu spălată cu acetonă.

Metoda de evaluare a concentrației metaboliților ftalaților în lichid folicular presupune incubarea enzimatică, derivatizarea și cuantificarea acestora prin cromatografie în fază gazoasă. Toate soluțiile standard se prepară în sticlărie de laborator, care a fost încălzită la 200°C timp de trei ore, spălată cu acetonă și uscată. Peste 2 ml de probă de lichid folicular transferată într-un tub de sticlă borosilică se adaugă 500 μl acid fosforic, 700 μl acetat de amoniu 1M și se omogenizează proba prin agitare pe vortex 30 secunde. Se adaugă 100 μl standard intern și 100 μl enzimă

β -glucuronidaza în fiecare probă pentru a deconjuaga metaboliții ftalaților glucuronidați. Probele se acoperă cu folie de aluminiu (spălată cu acetonă și uscată), se agită ușor și se țin la incubat la 37°C într-o baie de apă închisă timp de 2,5 ore. După hidroliza enzimatică se adaugă 5 ml solvent de extracție (hexan:acetonă 80:20) la fiecare probă și se ultrasonează timp de 30 minute. Cu o pipetă Pasteur se înlătură faza apoasă, se adaugă 2 g sulfat de sodiu anhidru și se transferă faza organică într-o fiolă de evaporare. Se spală sulfatul de sodiu cu 1 ml solvent de extracție și se evaporă la sec sub un curent slab de azot la o temperatură de 45°C. Se adaugă 100 μ l agent de derivatizare - N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide cu 1% trimethylchlorosilane (BSTFA cu 1%TMCS) și 0,9 ml acetat de etil la fiecare probă. Se acoperă fiolele cu folie de aluminiu și se lasă în termoreactor la 65°C timp de 1 h. Se transvazează probele în vialuri de 1,5 ml, se acoperă cu folie de aluminiu înainte de a pune capacul vialului și se analizează pe GC-MS.

Analiza se realizează cu ajutorul unui cromatograf de gaze (GC Shimadzu-2010) cuplat cu un spectrometru de masă (Shimadzu QP 2010) și un autosampler (AOC 20i+s, Shimadzu Corporation). Compușii sunt separați pe o coloană capilară TraceGold TG-5MS, 5% difenil-95% dimetilpolisiloxan (lungime 30m, diametru interior 0,25mm, grosimea filmului 0,25mm). Spectrele de masă se obțin prin fragmentarea compușilor cu ionizare electronică de impact (70 eV), iar cuantificarea se face pe curba de calibrare a metodei a fost efectuată în cinci puncte pentru fiecare compus, obținându-se concentrația în μ g/ml pentru fiecare compus.