



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2011 00724**

(22) Data de depozit: **22.07.2011**

(41) Data publicării cererii:  
**30.07.2013** BOPI nr. **7/2013**

(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;**  
• **ROMAN CECILIA, STR. PIAȚA ABATOR,  
BL.B, AP.58, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**

• **SENILA LĂCRĂMIOARA, STR. BUCIUM  
NR.1, BL.B1, AP.30, ET.7, CLUJ-NAPOCA,  
CJ, RO;**  
• **LEVEI ERIKA, STR. EROILOR NR. 76,  
AP. 8, FLOREȘTI, CJ, RO;**  
• **ROMAN MARIUS, BD.MUNCII NR.87A,  
AP.52, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**  
• **GOG ADRIANA, STR.FLORILOR NR.184,  
BL.C5, AP.51, FLOREȘTI, CJ, RO**

(54) **METODĂ DE DETERMINARE A HORMONILOR STEROIDIENI  
ÎN MATRICE APOASĂ PRIN GC-MS, DUPĂ  
MICROEXTRAȚIE ÎN FAZĂ SOLIDĂ (SPME) ȘI  
DERIVATIZARE PE FIBRĂ**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la o metodă de determinare a hormonilor steroidieni în matrice apoasă, prin micro-extracție pe fază solidă, derivatizare pe fibră și detectare. Conform invenției, în proba de apă introdusă într-un flacon prevăzut cu septum și cu agitare magnetică se imersează, la 25...45°C, timp de 100...120 min, o fibră de 85 μm din poliacrilat, se adaugă NaCl pentru descreșterea solubilității hor-

monilor, apoi analiții se derivatizează pe fibră prin sililare cu N-metil-N- trimetilsilil-trifluoracetamidă, la 25...40°C, timp de 40...60 min, după care derivații sililați ai hormonilor se determină simultan, prin cromatografie gazoasă, cuplată cu spectrometrie de masă.

Revendicări: 1  
Figuri: 2



## DESCRIERE

Invenția se referă la o metodă analitică de determinare a hormonilor steroidieni (estronă și  $\beta$ -estradiol) în matrice apoasă, prin microextracție pe fază solidă cu imersare directă a fibrei (DI-SPME), urmată de derivatizare pe fibră în headspace cu N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamidă (MSTFA) și detecție prin gaz cromatografie capilară cuplată cu spectrometrie de masă (GC-MS).

În ultima perioadă există o preocupare continuă legată de disruptori endocrieni care afectează viața animalelor și a oamenilor. Estrona și  $\beta$ -estradiolul pot avea efecte adverse chiar și în cantități mici [1, 2]. Hormonii steroidieni se găsesc în apele naturale și în apele reziduale provenite de la stațiile de tratare a apei [3, 4].

În străinătate se aplică metode analitice pentru detecția și cuantificarea estronei și a  $\beta$ -estradiolului, cum sunt: gaz cromatografia cuplată cu spectrometria de masă (GC-MS) sau cu spectrometria de masă în tandem (GC-MS-MS), lichid cromatografia cuplată cu spectrometria de masă (LC-MS) sau cu spectrometria de masă în tandem (LC-MS-MS) [5, 6].

În țară, după informațiile noastre, nu s-a utilizat sau aplicat o metodă analitică pentru determinarea hormonilor steroidieni (estronă și  $\beta$ -estradiol) în probe de apă (apă potabilă, de suprafață, reziduală) prin tehnica DI-SPME-GC-MS, cu derivatizare cu MSTFA pe fibră.

Scopul prezentei invenții este elaborarea unei metode analitice de determinare a hormonilor steroidieni (estronă și  $\beta$ -estradiol) în matrice apoasă, prin extracție SPME, urmată de derivatizarea analiților cu MSTFA și detecție simultană prin gaz cromatografie capilară cuplată cu spectrometrie de masă (GC-MS).

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este elaborarea unei metode analitice rapide, economice, foarte versatile, extrem de sensibile și selective de determinare a hormonilor steroidieni (estronă și  $\beta$ -estradiol) în probe de apă potabilă, de suprafață sau reziduale prin utilizarea unei metode de microextracție în fază solidă pe fibră polimerică specifică, care permite extracția rapidă și specifică a analiților, fără interferențe de matrice și care nu necesită utilizarea solvenților organici toxici, urmată de derivatizarea analiților cu MSTFA în vederea creșterii volatilității lor, apoi separarea, identificarea, detecția și cuantificarea simultană a celor doi analiți cu GC-MS pe coloană capilară. Întreaga metodă analitică propusă se

## Descrierea invenției

---

remarcă prin simplitate și rapiditate, permite obținerea unor limite de detecție extrem de scăzute, are mare potențial pentru analize efectuate la locul recoltării, permite analiza unor volume reduse de probe de apă, eliminând complet utilizarea solvenților organici toxici.

Datorită unei slabe volatilitati a compușilor steroidieni este necesară o etapă de derivatizare pentru producerea unor produși mai volatili și pentru îmbunătățirea sensibilității. Sililarea contaminanților chimici înainte de analiza prin gaz cromatografie duce la formarea unor compuși sililați stabili și volatili, care pot fi analizați prin GC.

Metoda propusă permite determinarea unor hormoni naturali (estona și  $\beta$ -estradiolul) din probe cu matrice apoasă. Metoda folosită la extracția analiților din probe este microextracția în fază solidă (SPME) prin imersarea directă în probele de apă, sililarea pe fibră, urmată de determinare simultana a derivaților sililați prin gaz cromatografie cuplată cu spectrometria de masă. N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA) a fost folosit ca și agent de derivatizare, pentru îmbunătățirea sensibilității și selectivității hormonilor analizați.

În figura 1 sunt prezentate etapele metodei analitice de determinare a hormonilor steroidieni în probe cu matrice apoasă.

Pentru extracțiile SPME se utilizează o fibră de poliacrilat (PA) de 85  $\mu$ m, care, anterior fiecărei utilizări, este condiționată în modul split în inletul gaz cromatografului, timp de 2 ore, la 300°C.

Proba de apă recoltată se filtrează pentru îndepărtarea suspensiilor. Un volum  $V$  de probă se introduce într-un flacon sigilat, acoperit cu septum, prevazut cu agitator magnetic. Se adaugă clorură de sodiu (10%) pentru descreșterea solubilității hormonilor steroidieni.

Extracția se efectuează prin introducerea fibrei în flacon prin septum în proba de apă, la temperatura de 25...45°C, timp de 100...120 minute. Analiții se adsorb în învelișul fibrei, iar după terminarea timpului de extracție, fibra este trasă în ac și acul este retras din flacon.

Derivatizarea analiților are loc prin tehnica headspace, prin expunerea fibrei în vapori de  $V \mu$ l MSTFA, timp de 40...60 minute, la 25...45°C.

Analiza gaz cromatografică a hormonilor steroidieni din apă (identificarea și cuantificarea) se efectuează prin injectarea fibrei în inletul gaz cromatografului, în modul „splitless”, menținut izoterm la 290°C, timpul de desorbție fiind de 5 minute.

### Descrierea invenției

Coloana capilară nepolară utilizată este de tipul HP-5MS, 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm. Gazul purtător este He de înaltă puritate, cu un debit de 1 ml/min. Programul aplicat pentru temperatura coloanei în GC este următorul: temperatura inițială este de 90°C, menținută pentru 2 minute, de la 90 la 180°C cu o rampă de 30°C/minute; de la 180 la 240°C cu o rampă de 10°C/min; de la 240 la 270°C cu 3°C/minute; 270 la 300°C la 15°C/min și menținută la 300°C pentru 2 minute. Operarea spectrometrului de masă se efectuează în modul SIM pentru derivații sililați ai hormonilor steroidieni analizați: 342 și 416 pentru estronă și respectiv pentru β-estradiol.

Parametrii de performanță ai metodei, exprimați prin limitele de detecție și gradele de recuperare a analiților sunt:

- limitele de detecție pentru estronă și β-estradiol: 0,013 μg/l și, respectiv 0,008 μg/l,
- gradele de recuperare pentru estronă și β-estradiol: 89% și, respectiv 93%.

1. Shore, L.S., Shemesh, M., Naturally produced steroid hormones and their release into the Environment, *Pure and Applied Chemistry*, 75, **2003**, 1859-1871.
2. Jiang, J.Q., Yin, Q., Zhou, J.L., Pearce, P., Occurrence and treatment trials of endocrine disrupting chemicals (EDCs) in wastewaters, *Chemosphere*, 61, **2005**, 544-550.
3. Neale, A. N., Escher, B.I., Schäfer, A.I., pH dependence of steroid hormone—organic matter interactions at environmental concentrations, *Science of the Total Environment*, 407, **2009**, 1167-1173.
4. Zhang, Z., Duan, H., Zhang, L., Chen, X., Liu, W., Chen, G., Direct determination of anabolic steroids in pig urine by a new SPME—GC—MS method, *Talanta*, 78, **2009**, 1083-1089.
5. Sebok, A., Vasanits-Zsigrai, A., Helenkar, A., Zaray, Gy., Molnar-Perl, I., Multiresidue analysis of pollutants as their trimethylsilyl derivatives, by gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1216, **2009**, 2288-2301.
6. Ouyang, G., Pawliszyn, J., Recent developments in SPME for on-site analysis and monitoring, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 25, **2006**, 692-703.

Revendicare

---

## REVENDICARE

Metodă de determinare a hormonilor steroidieni în matrice apoasă, prin GC-MS, după microextracție în fază solidă (SPME) și derivatizare pe fibră **caracterizată prin aceea că** are la bază determinarea hormonilor steroidieni (estronă și  $\beta$ -estradiol) în matrice apoasă, prin extracție SPME (filtrare proba, extracția se efectuează prin introducerea fibrei în flaconul prevazut cu septum la temperatura de 25...45°C, timp de 100...120 minute), urmată de derivatizarea analiților cu MSTFA (timp de 40...60 minute, la temperatura de 25...45°C) și detecție simultană prin gaz cromatografie capilară cuplată cu spectrometrie de masă (GC-MS).

---

Director ICIA,  
CS II Mircea Chintoanu



Desene

---

---

## DESENE

**Figura 1.** Etapele metodei analitice de determinare a hormonilor steroidieni în matrice apoasă, prin GC-MS, după microextracție în fază solidă (SPME) și derivatizare pe fibră

**Figura 2.** Cromatograma SIM a hormonilor steroidieni analizați din apă, după microextracție în fază solidă (SPME) și derivatizare pe fibră

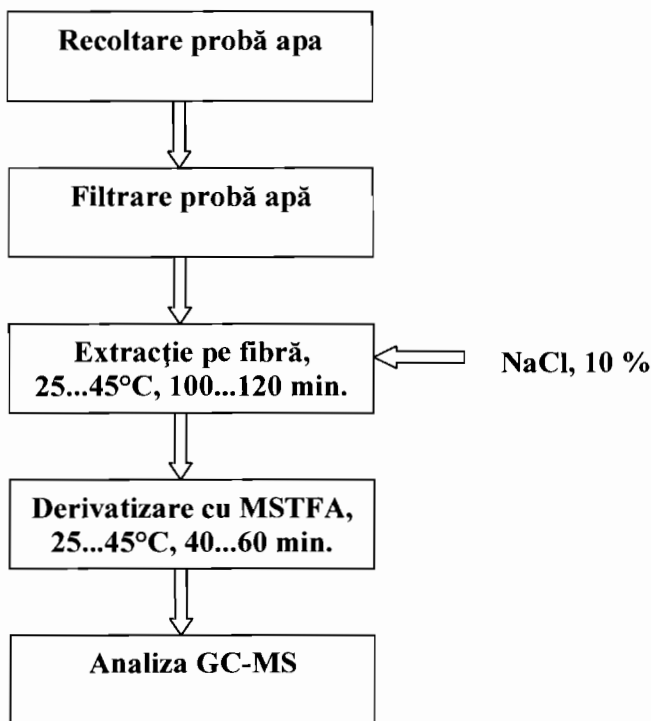
---

---

Director ICIA,  
CS II Mircea Chintoanu

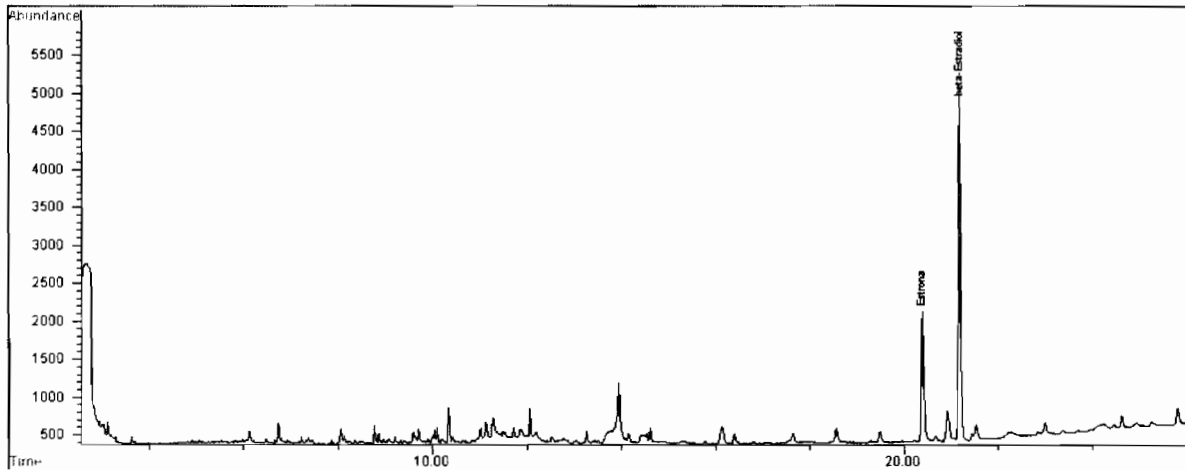

**Figura 1. Etapele metodei analitice de determinare a hormonilor steroidieni în matrice apoasă, prin GC-MS, după microextracție în fază solidă (SPME) și derivatizare pe fibră**



Director ICIA,  
CS II Mircea Chintoanu



**Figura 2. Cromatograma SIM a hormonilor steroidieni analizați din apă, după microextracție în fază solidă (SPME) și derivatizare pe fibră**



Director ICIA,  
CS II Mircea Chintoanu

