



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

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

(22) Data de depozit: **22/07/2011**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/05/2017** BOPI nr. **5/2017**

(41) Data publicării cererii:  
**30/07/2013** BOPI nr. **7/2013**

(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, BL.E, AP.5, FLOREȘTI, CJ, RO;**  
• **ROMAN CECILIA, PIAȚA ABATOR, BL.B, AP.58, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**  
• **ȘENILĂ LĂCRIMIOARA, STR.BUCIUM NR.1, BL.B 1, ET.7, AP.30, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**  
• **LEVEI ERIKA, STR. EROILOR NR. 76, AP. 8, FLOREȘTI, CJ, RO;**

• **ROMAN MARIUS, BD.MUNCII NR.87 A, AP.52, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**  
• **GOG ADRIANA, STR.FLORILOR NR.184, BL.C 5, AP.51, FLOREȘTI, CJ, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**GANGFENG OUYANG, JANUSZ PAWLISZYN, "RECENT DEVELOPMENTS IN SPME FOR ON-SITE ANALYSIS AND MONITORING", ANALYTICAL CHEMISTRY, NR. 7, VOL. 25, 2006; A. SEBOK, A. VASANITS-ZSIGRAI, A. HELENKAR, GY. ZARAY, I. MOLNAR-PERL, "MULTIRESIDUE ANALYSIS OF POLLUTANTS AS THEIR TRIMETHYLSILYL DERIVATIVES, BY GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, VOL. 1216, PP. 2288-2301, 2009**

(54) **METODĂ DE DETERMINARE A HORMONILOR STEROIDIENI ÎN MATRICE APOASĂ**



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

7 În ultima perioadă, există o preocupare continuă legată de disruptorii endocrini care  
afectează viața animalelor și a oamenilor. Estrona și β-estradiolul pot avea efecte adverse chiar  
și în cantități mici, așa cum este prezentat de Shore (L. S., Shemesh M., în *Naturally  
9 produced steroid hormones and their release into the Environment, Pure and Applied  
Chemistry, 75, 2Q03, 1859-1871*), și de Jiang, (J. Q., Yin Q., Zhou J. L., Pearce P., în  
11 *Occurrence and treatment trials of endocrine disrupting chemicals (EDCs) in  
wastewaters, Chemosphere, 61, 2005, 544-550*). Hormonii steroidieni se găsesc în apele  
13 naturale și în apele reziduale, provenite de la stațiile de tratare a apei (Neale A. N., Escher B.I.,  
Schäfer, A. I., *pH dependence of steroid hormone-organic matter interactions at  
15 environmental concentrations, Science of the Total Environment, 407, 2009, 1167-1173*  
și Zhang Z., Duan H., Zhang L., Chen X., Liu W., Chen G., *Direct determination of anabolic  
17 steroids in pig urine by a new SPME-GC-MS method, Talanta, 78, 2009, 1083-1089*).

19 În străinătate, se aplică metode analitice pentru detecția și cuantificarea estronei și a  
β-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  
21 spectrometria de masă (LC-MS) sau cu spectrometria de masă în tandem (LC-MS-MS), vezi  
Sebok A., Vasanits-Zsigrai A., Helenkar A., Zaray Gy., Molnar-Perl I., *Multiresidue analysis  
23 of pollutants as their trimethylsilyl derivatives, by gas chromatography-mass  
spectrometry, Journal of Chromatography A, 1216, 2009, 2288-2301* și în Ouyang G.,  
25 Pawliszyn J., *Recent developments in SPME for on-site analysis and monitoring, TrAC  
Trends in Analytical Chemistry, 25, 2006, 692-703*.

27 Problema pe care o rezolvă invenția constă în elaborarea unei metode analitice de  
determinare a hormonilor steroidieni (estronă și β-estradiol) în matrice apoasă, prin extracție  
29 SPME, urmată de derivatizarea analiților cu MSTFA și detecție simultană prin gaz cromatografie  
capilară cuplată cu spectrometrie de masă (GC-MS).

31 Metoda de determinare a hormonilor steroidieni în matrice apoasă conform invenției înlă-  
tură dezavantajele de mai sus prin aceea că proba de apă se recoltează, se filtrează pentru  
33 îndepărtarea suspensiilor, apoi se supune etapei de microextracție în fază solidă, prin utilizarea  
unei fibre de poliacrilat de 85 μm, la temperatura de 25...45°C, timp de 100...120 min, urmată  
35 de derivatizarea analitului în vapori de N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamidă timp de  
40...60 min, la temperatura de 25...45°C, și de identificarea și cuantificarea simultană prin gaz  
37 cromatografie capilară cuplată cu spectrometrie de masă la 290°C, timp de 5 min.

Prin aplicarea invenției, se obțin următoarele avantaje:

- 39 - o metodă analitică rapidă, economică, foarte versatilă, extrem de sensibilă și selectivă;
- nu necesită utilizarea solvenților organici toxici;
- 41 - are mare potențial pentru analize efectuate la locul recoltării;
- permite analiza unor volume reduse de probe de apă.

43 Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este elaborarea unei metode analitice  
rapide, economice, foarte versatile, extrem de sensibile și selective, de determinare a hormo-  
45 nilor steroidieni (estronă și β-estradiol) în probe de apă potabilă, de suprafață sau reziduală,  
prin utilizarea unei metode de microextracție în fază solidă pe fibră polimerică specifică, care  
47 permite extracția rapidă și specifică a analiților, fără interferențe de matrice, și care nu necesită

# RO 128663 B1

utilizarea solvenților organici toxici, urmată de derivatizarea analiților cu MSTFA, în vederea creșterii volatilității lor, apoi de separarea, identificarea, detecția și cuantificarea simultană a celor doi analiți cu GC-MS pe coloană capilară. Întreaga metodă analitică propusă se remarcă prin simplitate și rapiditate, permite obținerea unor limite de detecție extrem de scăzute, are mare potențial pentru analize efectuate la locul recoltării, și permite analiza unor volume reduse de probe de apă, eliminând complet utilizarea solvenților organici toxici.

Datorită unei slabe volatilități a compușilor steroidieni, este necesară o etapă de derivatizare, pentru producerea unor produși mai volatili și pentru îmbunătățirea sensibilității. Sililarea contaminațiilor chimice 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 (estronă 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 determinarea simultană a derivaților sililați prin gaz cromatografie cuplată cu spectrometria de masă. N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoro-acetamida (MSTFA) a fost folosită ca agent de derivatizare, pentru îmbunătățirea sensibilității și selectivității hormonilor analizați.

În continuare, se prezintă un exemplu de realizare a invenției, în legătură cu fig. 1...2, care reprezintă:

- fig. 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;

- fig. 2, cromatograma SIM a hormonilor steroidieni analizați din apă, după microextracție în fază solidă (SPME) și derivatizare pe fibră.

## Exemplul 1

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 h, 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, prevăzut 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 min. 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 min, 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 min.

Coloana capilară nepolară utilizată este de tipul HP-5MS, 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m. 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 min, de la 90 la 180°C cu o rampă de 30°C/min; de la 180 la 240°C cu o rampă de 10°C/min; de la 240 la 270°C cu 3°C/min; de la 270 la 300°C la 15°C/min, și menținută la 300°C pentru 2 min. Operarea spectrometrului de masă se efectuează în modul SIM pentru derivații sililați ai hormonilor steroidieni analizați: 342 și 416 pentru estronă și, respectiv, pentru  $\beta$ -estradiol.

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

- limitele de detecție pentru estronă și  $\beta$ -estradiol: 0,013  $\mu$ g/l și, respectiv, 0,008  $\mu$ g/l;
- gradele de recuperare pentru estronă și  $\beta$ -estradiol: 89% și, respectiv, 93%.

# RO 128663 B1

1

## Revendicare

3

Metodă de determinare a hormonilor steroidieni în matrice apoasă, **caracterizată prin aceea că** proba de apă se recoltează, se filtrează pentru îndepărtarea suspensiilor, apoi se supune etapei de microextracție în fază solidă, prin utilizarea unei fibre de poliacrilat de 85 μm, la temperatura de 25...45°C, timp de 100...120 minute, urmată de derivatizarea analitului în vapori de N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamidă timp de 40...60 min, la temperatura de 25...45°C, și identificarea și cuantificarea simultană prin gaz cromatografie capilară cuplată cu spectrometrie de masă la 290°C, timp de 5 min.

5

7

9

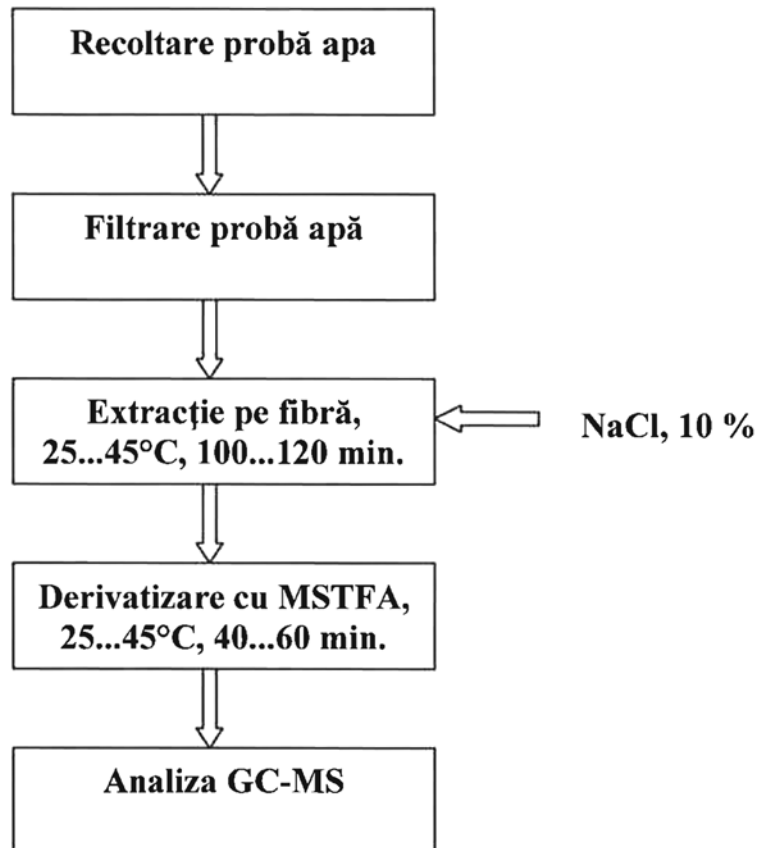


Fig. 1

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01);

G01N 33/48 (2006.01)

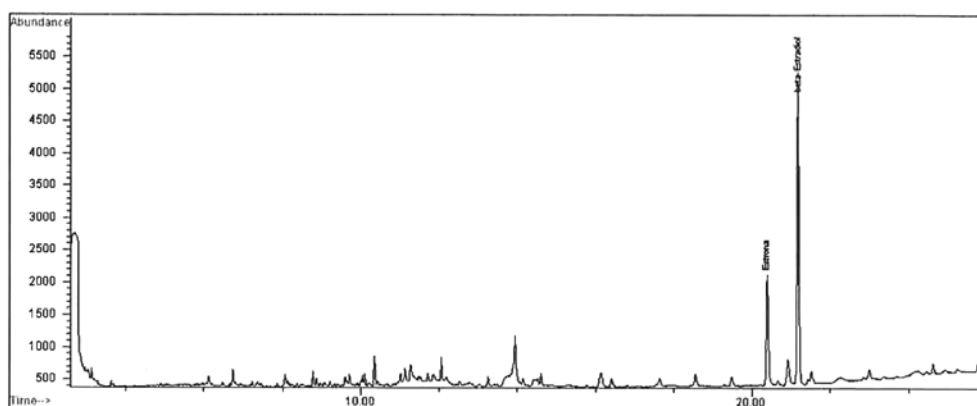


Fig. 2



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM  
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci  
sub comanda nr. 231/2017