



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2011 00725

(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, BLE, 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 UNOR HORMONI
STEROIDIENI (ESTRONĂ, B-ESTRADIOL) ÎN MATRICE
APOASĂ PRIN EXTRAȚIE PE BAZĂ SOLIDĂ (SPE),
DERIVATIZARE ȘI DETECȚIE PRIN GAZ, CROMATOGRAFIE
CUPLATĂ CU SPECTROMETRIEDE MASĂ (GC-MS)

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la o metodă de determinare a hormonilor steroidieni în matricea apoasă, prin extracție pe fază solidă, derivatizare și detecție prin cromatografie gazoasă, cuplată cu spectrometrie de masă. Conform invenției, proba de apă filtrată și acidulată la pH 4...6 se trece printr-un cartuș care a fost condiționat în prealabil, analiții sunt eluați cu hexan:acetat de etil:metanol 5:5:14, soluțiile eluate se evaporă la 40°C, extractul se derivatizează la 25...45°C timp de 60...90 min, prin sililare cu N-metil-N-trimetil-silil-trifluoracetamidă, și derivații sililați ai hormonilor sunt analizați simultan, prin cromatografie gazoasă, cuplată cu spectroscopie de masă.

Revendicări: 1
Figuri: 2

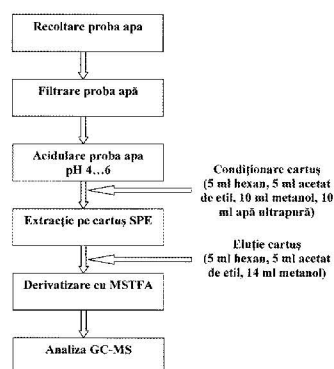


Fig. 1

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).



P

DESCRIERE

Invenția se referă la o metodă analitică de determinare extrem de sensibilă și specifică a hormonilor steroidieni (estronă și β -estradiol) în matrice apoasă (apă potabilă, apă reziduală, apă de suprafață), prin extracție pe fază solidă (SPE), urmată de derivatizarea analiților cu MSTFA (N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida) și detecție simultană prin gaz cromatografie capilară cuplată cu spectrometrie de masă (GC-MS).

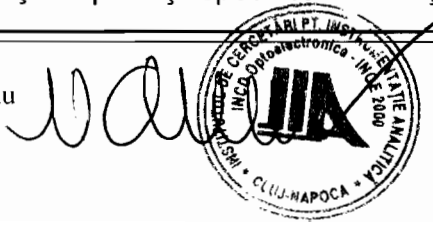
Compușii cu acțiune estrogenică puternică, cum sunt estrona și β -estradiolul pot avea efecte negative severe asupra sănătății umane și animale la concentrații extrem de reduse [1-5]. Ei sunt răspândiți în mediul acvatic provenind de la efluenții industriali sau municipali, cu impact major asupra apei potabile [6-8]. Datorită concentrațiilor foarte scăzute în mediul apos sunt necesare metode de extracție și determinare foarte sensibile și precise.

În străinătate se aplică metoda de extracție prin SPE (extracție în fază solidă) pentru extracția, detecția și cuantificarea estronei și a β -estradiolului, urmată de determinare gaz cromatografică cu spectrometria de masă (GC-MS) [9]. În general, derivatizarea se efectuează în două etape: oximare și sililare cu BSTFA, însă compușii derivatizați cu MSTFA sunt mult mai volatili decât cei derivatizați cu BSTFA.

În țară, după informațiile noastre, nu s-a utilizat sau aplicat o metodă analitică pentru determinarea hormonilor steroidieni (estronă și β -estradiol) în probe cu matrice apoasă prin tehnica SPE-GC-MS, cu derivatizare într-o singură etapă cu MSTFA.

Scopul prezentei invenții este elaborarea unei metode analitice de determinare a hormonilor steroidieni (estronă și β -estradiol) în matrice apoasă, prin extracție SPE, 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, extrem de sensibile și selective de determinare a hormonilor steroidieni (estronă și β -estradiol) în probe de apă potabilă, de suprafață sau reziduale prin utilizarea unei metode de extracție în fază solidă pe cartuș specific, care permite extracția rapidă și specifică a analiților, fără interferențe de matrice,



Descrierea invenției

urmată de derivatizarea lor 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 remarcă prin capacitatea sa de a analiza volume reduse de probe de apă, utilizând volume reduse de solvenți organici toxici.

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

Datorită unei slabe volatilități 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 (estronă și β -estradiolul) din probe cu matrice apoasă. Metoda folosită la extracția analiților din probe este extracția pe fază solidă (SPE) prin trecerea probei de apă filtrate și acidulate (pH de 4.. 6) pe cartuș (după condiționarea prealabilă a acestuia cu 5 ml hexan, 5 ml acetat de etil, 10 ml metanol și 10 ml apă ultrapură). Cartușul este uscat la vacuum, iar analiții sunt eluați cu 5 ml hexan, 5 ml acetat de etil și 14 ml metanol. Eluenții, uniți într-o singură fază, se evaporă la sec cu un evaporator rotativ, la temperatura de 40°C. La extractul obținut se adaugă $V \mu\text{l}$ MSTFA pentru derivatizare, timp de 60...90 minute, la temperatura de 25...45 °C, pe o baie de apă. N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoro- acetamida (MSTFA) a fost folosit ca și agent de derivatizare, pentru îmbunătățirea sensibilității și selectivității hormonilor analizați.

Separarea, identificarea și cuantificarea hormonilor steroidieni prin analiză gaz cromatografică se efectuează prin injectarea în inletul gaz cromatografului a $V \mu\text{l}$ extract derivatizat în modul „splitless”, menținut izoterm la 290°C, timpul de desorbție fiind de 5 minute. Gazul purtător este He de înaltă puritate, cu un debit de 1 ml/min. Programul 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.

Descrierea invenției

Parametrii de performanță ai metodei SPE-GC-MS, pentru analiții investigați sunt:

- limitele de determinare pentru estronă și β-estradiol: 0,003 μg/l, respectiv 0,004 μg/l;
- gradele de recuperare pentru estronă și β-estradiol: 103%, respectiv 95%.

În figura 2 este prezentată cromatograma hormonilor steroidieni analizați din apă.

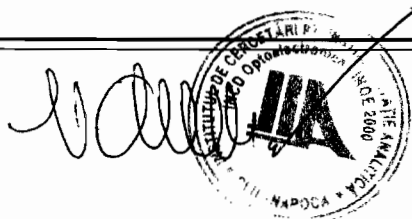
1. A. Sebök, A. Vasanits-Zsigrai, A. Helenk, G. Záray, I. Molnár-Perl, Multiresidue analysis of pollutants as their trimethylsilyl derivatives by gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, **2009**, 1216, 2288-2301.
2. Á. Sebök, K. Sezer, A. Vasanits-Zsigrai, A. Helenkár, Gy. Záray, I. Molnár-Perl, Gas chromatography-mass spectrometry of the trimethylsilyl (oxime) ether/ester derivatives of cholic acids: Their presence in the aquatic environment, *Journal of Chromatography A*, **2008**, 1211, 104-112.
3. Á. Sebök, A. Vasanits-Zsigrai, Gy. Palkó, Gy. Záray, I. Molnár-Perl, Identification and quantification of ibuprofen, naproxen, ketoprofen and diclofenac present in waste-waters, as their trimethylsilyl derivatives, by gas chromatography mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, **2008**, 76, 642-650.
4. J. C. Durán-Alvarez, E. Becerril-Bravo, V. S. Castro, B. Jiménez, R. Gibson, The analysis of a group of acidic pharmaceuticals, carbamazepine, and potential endocrine disrupting compounds in wastewater irrigated soils by gas chromatography-mass spectrometry, *Talanta*, **2009**, 78, 1159-1166.
5. C-Y. Chen, T-Y. Wen, G-S. Wang, H-W. Cheng, Y-H. Lin, G-W. Lien, Determining estrogenic steroids in Taipei waters and removal in drinking water treatment using high-flow solid-phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Science of the Total Environment*, **2007**, 378, 352-365.
6. M.L. Jugan, L. Oziol, M. Bimbot, V. Huteau, S. Tamisier-Karolak, J.P. Blondeau, Y. Lévi, In vitro assessment of thyroid and estrogenic endocrine disruptors in wastewater treatment plants, rivers and drinking water supplies in the greater Paris area (France), *Science of the Total Environment*, **2009**, 407, 579-3587.
7. D.P. Grover, Z.L. Zhang, J.W. Readman, J.L. Zhou, A comparison of three analytical techniques for the measurement of steroidal estrogens in environmental water samples, *Talanta*, **2009**, 78, 1204-1210.
8. H-S. Chang, K-H. Choo, B. Lee, S-J. Choi, The methods of identification, analysis, and removal of endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, *Journal of Hazardous Materials*, **2009**, 172, 1-12.
9. R. Liu, J. L. Zhou, A. Wilding, Simultaneous determination of endocrine disrupting phenolic compounds and steroids in water by solid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, **2004**, 1022, 179-189.



*Revendicare***REVENDICARE**

Metodă de determinare a hormonilor stroidieni (estronă, β -estradiol) în matrice apoasă prin extracție pe fază solidă (SPE), derivatizare și detecție prin gaz cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă (GC-MS) **caracterizată prin aceea că** are la bază determinarea hormonilor steroidieni (estronă și β -estradiol) în matrice apoasă, prin extracție SPE (trecerea probei de apă filtrate și acidulate (pH de 4.. 6) pe cartuș), urmată de o singură etapă de derivatizare a extractului obținut (V μ l MSTFA pentru derivatizare, timp de 60...90 minute, la temperatura de 25...45 °C), în final analiza simultană prin gaz cromatografie capilară cuplată cu spectrometrie de masă (GC-MS).

Director ICIA,
CS II Mircea Chintoanu



DESENE

Figura 1. Metodă de determinare a hormonilor stroidieni (estronă, β -estradiol) în matrice apoasă prin extracție pe fază solidă (SPE), derivatizare și detecție prin gaz cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă (GC-MS)

Figura 2. Cromatograma SIM a hormonilor steroidieni analizați din apă

Director ICIA,
CS II Mircea Chintoanu



Fig. 1 Etapele metodei analitice de determinare a hormonilor steroidieni (estronă și β -estradiol) din probe apoase prin SPE-GC-MS

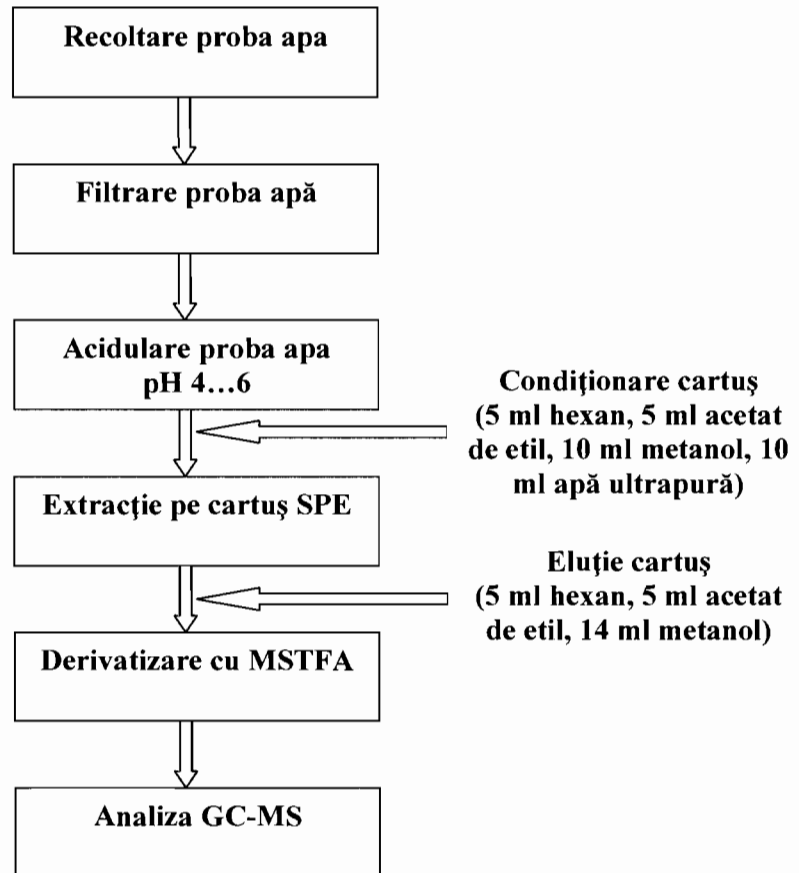
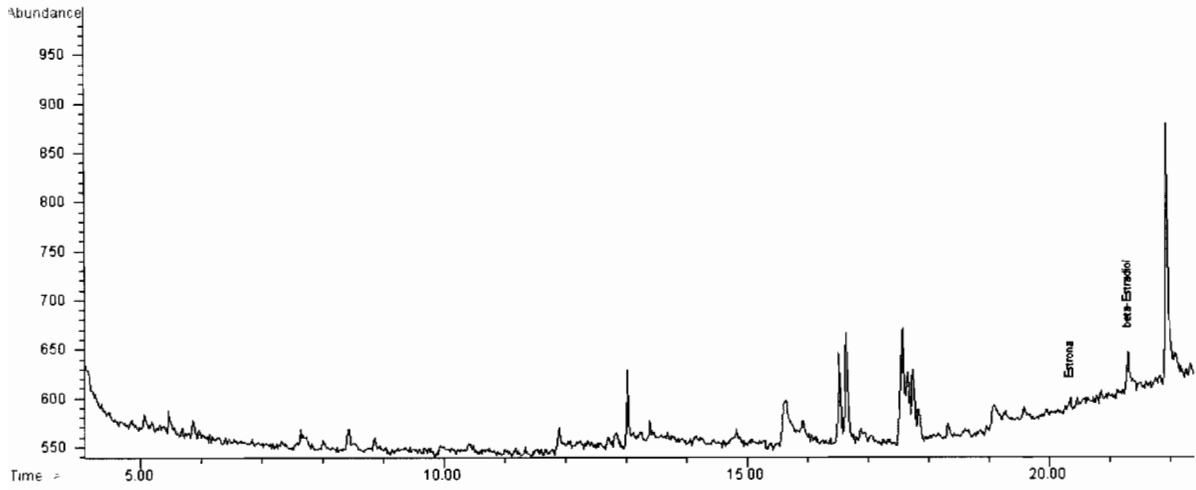


Figura 2. Cromatograma SIM a hormonilor steroidieni analizați din apă



Director ICIA,
CS II Mircea Chintoanu

