



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2011 00725**

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/06/2017** BOPI nr. **6/2017**

(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 ESTRONĂ ȘI  $\beta$ -ESTRADIOL ÎN MATRICE APOASĂ**



1           Invenția se referă la o metodă analitică extrem de sensibilă și specifică de determi-  
3 nare a hormonilor steroidieni estronă și  $\beta$ -estradiol în matrice apoasă (apă potabilă, apă rezi-  
duală, apă de suprafață), prin extracție pe fază solidă (SPE), urmată de derivatizarea  
5 analiților cu MSTFA (N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoro-acetamida) și detecție simultană prin gaz  
cromatografie capilară, cuplată cu spectrometrie de masă (GC-MS).

7           Compușii cu acțiune estrogenică puternică, cum sunt estrona și  $\beta$ -estradiolul, pot  
avea efecte negative severe asupra sănătății umane și animale, la concentrații extrem de  
9 reduse (vezi **A. Sebok, A. Vasanits-Zsigrai, A. Helenk, G. Záray, I. Moinár-Perl, *Multiresidue analysis of pollutants as their trimethylsilyl derivatives by gas chromatography-mass spectrometry*, Journal of Chromatography A, 2009, 1216, 2288-2301; Á. Sebok, K. Sezer, A. Vasanits-Zsigrai, A. Helenkar, Gy. Záray, I. Moinár-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; Á. Sebok, A. Vasanits-Zsigrai, Gy. Palko, Gy. Záray, I. Moinár-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; J. C. Durán-Alvarez, E. Becerril-Bravo, V. S. Castro, B. Jimenez, 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; 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). Aceștia sunt răspândiți în mediul acvatic provenind de  
21 la efluenții industriali sau municipale, cu impact major asupra apei potabile (vezi **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, 579-587; 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; 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, 772, 1-12). Datorită concentrațiilor foarte scăzute în mediul  
35 apos, sunt necesare metode de extracție și determinare foarte sensibile și precise.****

37           În alte state se aplică metoda de extracție prin SPE (extracție în fază solidă) pentru  
41 extracția, detecția și cuantificarea estronei și a  $\beta$ -estradiolului, urmată de determinare gaz  
cromatografică cu spectrometria de masă (GC-MS) (vezi **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, 7022, 179-189**). În general, derivatizarea se efec-  
43 tuează în două etape: oximare și sililare cu BSTFA, însă compușii derivatizați cu MSTFA  
sunt mult mai volatili decât cei derivatizați cu BSTFA.

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

# RO 128664 B1

Problema pe care o rezolvă invenția constă în elaborarea unei metode analitice de determinare a hormonilor steroidieni, estronă și  $\beta$ -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).

Metoda de determinare a hormonilor steroidieni estronă și  $\beta$ -estradiol în matrice apoasă, conform invenției, înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că se recoltează proba de apă, care se filtrează pentru îndepărtarea suspensiilor, apoi se supune etapei de extracție în fază solidă, prin trecerea probei de apă filtrată și acidulată la pH de 4...6 pe cartușul de extracție care a fost condiționat în prealabil cu 5 ml hexan, 5 ml acetat de etil, 10 ml metanol și 10 ml apă ultrapură; după extracție cartușul este uscat la vacuum, iar analiții sunt eluați cu 5 ml hexan, 5 ml acetat de etil și 14 ml metanol; eluenții sunt uniți într-o singură fază, se evaporă la sec la temperatura de 40°C, la extractul obținut se adaugă N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamidă, pentru derivatizare, timp de 60...90 min, la temperatura de 25...45°C, pe baie de apă, urmată de identificarea și cuantificarea simultană, prin gaz cromatografie capilară, cuplată cu spectrometrie de masă la 290°C, timp de 5 min.

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

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

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  $\beta$ -estradiol în probe de apă potabilă, de suprafață sau reziduale, prin utilizarea unei metode de extracție în fază solidă pe cartuș specific, ce permite extracția rapidă și specifică a analiților, fără interferențe de matrice, urmată de derivatizarea lor cu MSTFA, în vederea creșterii volatilității acestora, apoi separarea, identificarea, detecția și cuantificarea simultană a celor doi analiți cu GC-MS pe coloană capilară. Întreaga metodă analitică propusă se remarcă prin capabilitatea sa de a analiza volume reduse de probe de apă, utilizând volume reduse de solvenți organici toxici.

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

- fig. 1, metodă de determinare a hormonilor steroidieni (estronă,  $\beta$ -estradiol) în matrice apoasă, prin extracție pe fază solidă (SPE), derivatizare și detecție prin gaz cromatografie, cuplată cu spectrometrie de masă (GC-MS);
- fig. 2, cromatograma SIM a hormonilor steroidieni analizați din apă.

## Exemplul 1

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 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

# RO 128664 B1

1 un evaporator rotativ, la temperatura de 40°C. La extractul obținut se adaugă 5 μl MSTFA  
2 pentru derivatizare, timp de 60...90 min, la temperatura de 25...45°C, pe o baie de apă.  
3 N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoro-acetamida (MSTFA) a fost folosită ca și agent de derivatizare,  
4 pentru îmbunătățirea sensibilității și selectivității hormonilor analizați.

5 Separarea, identificarea și cuantificarea hormonilor steroidieni prin analiză gaz  
6 cromatografică se efectuează prin injectarea în inletul gaz cromatografului a 5 μl extract  
7 derivatizat în modul "splitless", menținut izoterm la 290°C, timpul de desorbție fiind de 5 min.  
8 Gazul purtător este He de înaltă puritate, cu un debit de 1 ml/min. Programul pentru tempera-  
9 tura coloanei în GC este următorul: temperatura inițială este de 90°C, menținută pentru  
10 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  
11 10°C/min; de la 240 la 270°C, cu 3°C/min; 270 la 300°C, la 15°C/min, și menținută la 300°C  
12 pentru 2 min. Operarea spectrometrului de masă se efectuează în modul SIM pentru derivații  
13 sililați ai hormonilor steroidieni analizați: 342 și 416 pentru estronă și, respectiv, pentru  
14 β-estradiol.

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

16 - limitele de determinare pentru estronă și β-estradiol: 0,003 μg/l, respectiv,  
17 0,004 μg/l;

- gradele de recuperare pentru estronă și β-estradiol: 103%, respectiv, 95%.

# RO 128664 B1

## Revendicare

1

Metodă de determinare a hormonilor steroidieni estronă și  $\beta$ -estradiol în matrice apoasă, **caracterizată prin aceea că** se recoltează proba de apă, care se filtrează pentru îndepărtarea suspensiilor, apoi se supune etapei de extracție în fază solidă, prin trecerea probei de apă filtrată și acidulată la pH de 4...6 pe cartușul de extracție care a fost condiționat în prealabil cu 5 ml hexan, 5 ml acetat de etil, 10 ml metanol și 10 ml apă ultrapură; după extracție cartușul este uscat la vacuum, iar analiții sunt eluați cu 5 ml hexan, 5 ml acetat de etil și 14 ml metanol; eluenții sunt uniți într-o singură fază, se evaporă la sec la temperatura de 40°C, la extractul obținut se adaugă N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamidă, pentru derivatizare, timp de 60...90 min, la temperatura de 25...45°C, pe baie de apă, urmată de identificarea și cuantificarea simultană, prin gaz cromatografie capilară, cuplată cu spectrometrie de masă la 290°C, timp de 5 min.

13

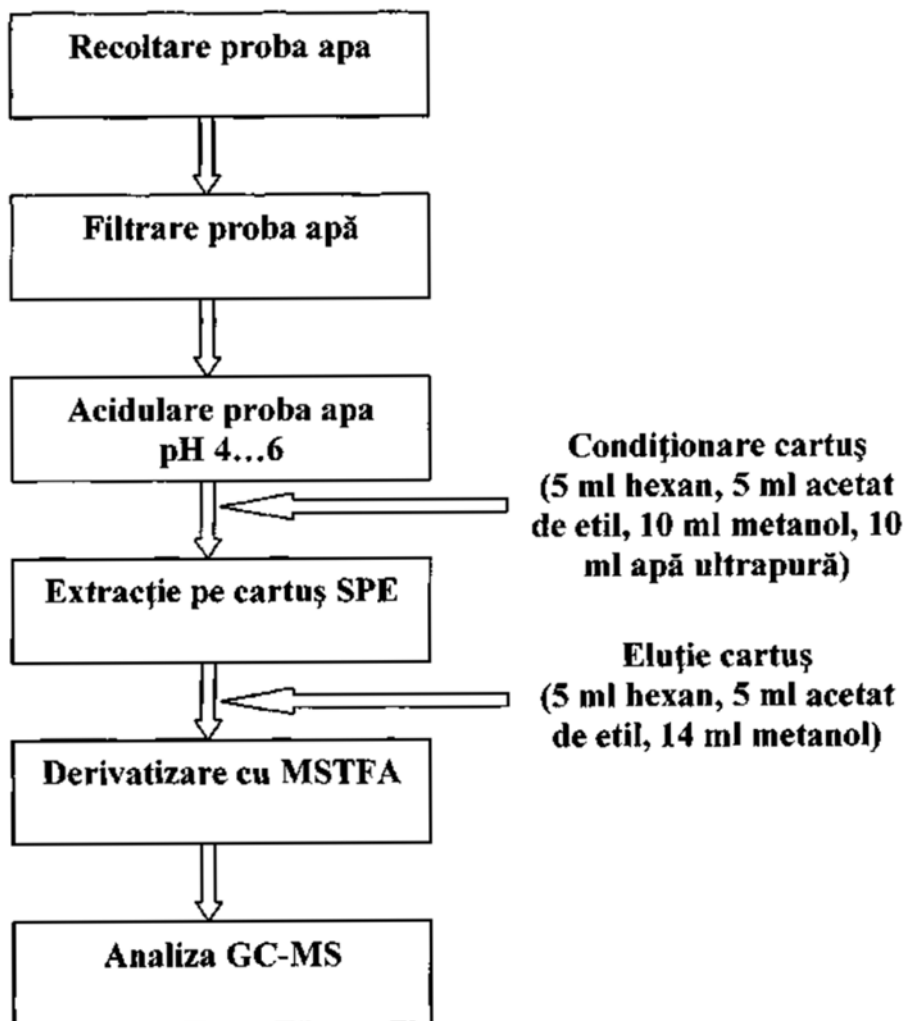


Fig. 1

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01);

G01N 33/48 (2006.01)

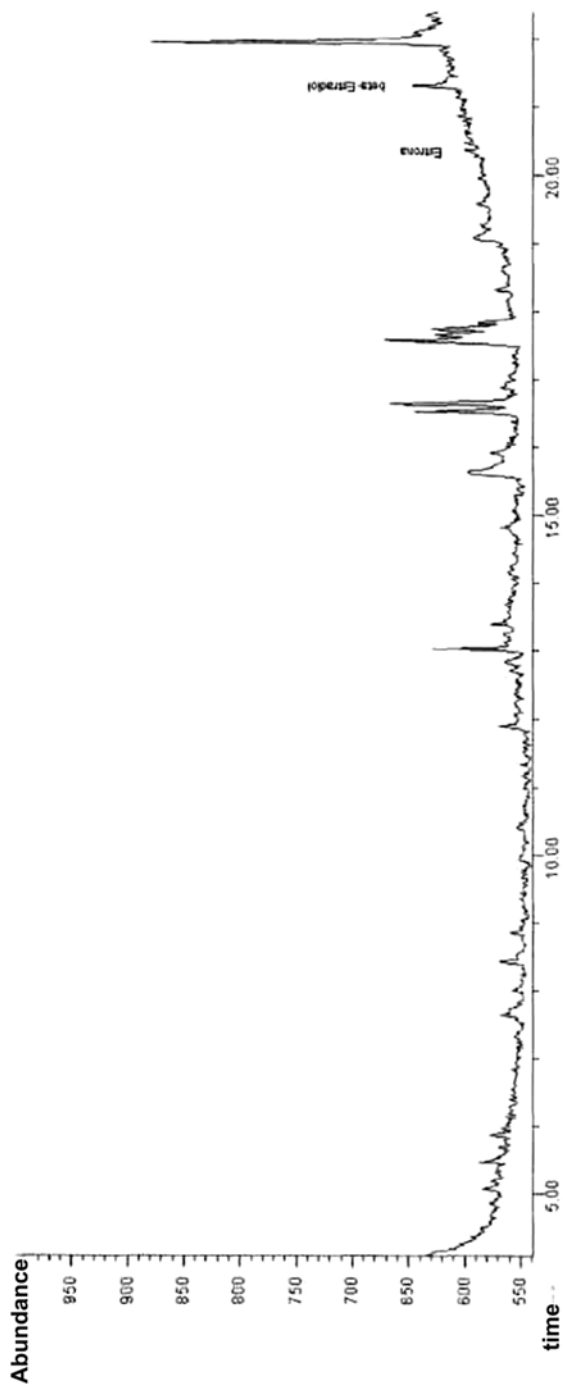


Fig. 2



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM  
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci  
sub comanda nr. 279/2017