



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2011 00726

(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 HORMONILOR STEROIDIENI
ÎN MATRICE BIOLOGICĂ (SER) PRIN GC-MS, DUPĂ
MICROEXTRACȚIE ÎN FAZĂ SOLIDĂ (SPME) ȘI
DERIVATIZARE PE FIBRĂ

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la o metodă analitică de determinare specifică, de mare sensibilitate, a hormonilor steroidieni în matrice biologică, prin microextracție pe fază solidă, derivatizare și detecție. Conform invenției, într-un flacon prevăzut cu septum și agitator magnetic, conținând serul separat din sânge, se introduce, prin septum, o fibră de poliacrilat de 85 μm, se adaugă NaCl, pentru scăderea solubilității estrogenilor, extracția se desfășoară la 25...45°C, timp de 100...120 min, în baie termostată, fibra se retrage și analiții se derivatizează cu N-metil-N-trimetilsilil-t rifluoracetamidă, și derivații sililați ai hormonilor se determină simultan, prin cromatografie gazoasă capilară, cuplată cu spectroscopie de masă.

Revendicări: 1
Figuri: 2

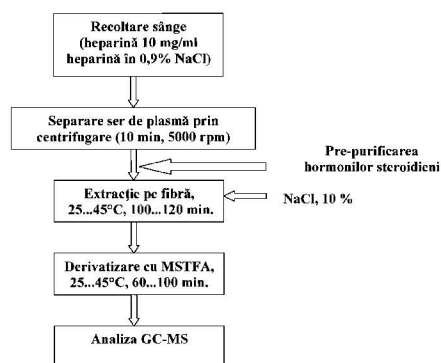


Fig. 1

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).



DESCRIERE

Invenția se referă la o metodă analitică de determinare extrem de sensibilă și specifică a hormonilor steroidieni (estronă și β -estradiol) în matrice biologică (ser din sânge), 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 simultan prin gaz cromatografie capilară cuplată cu spectrometrie de masă (GC-MS).

Creșterea pe scară largă a animalelor a dus la hrănirea animalelor din ferme cu estrogeni, fie în scop terapeutic, fie ca agenți anabolizanți meniți să crească eficiența alimentației animalelor destinate producției de carne și/sau lapte, iar prin aceasta a producțiilor lor. Aceste cantități de estrogeni pătrund, prin ingerarea cărnii și a produselor lactate ale animalelor, direct în organismul uman, provocând efecte secundare ale hiperestrogenismului atât la copii, cât și la adulți. Datorită concentrațiilor extrem de scăzute în mediul apos sunt necesare metode de extracție și determinare foarte sensibile și precise [1-3].

În străinătate se aplică metode analitice cuplate pentru extracția, detecția și cuantificarea estronei și a β -estradiolului, cum sunt: extracția lichid-lichid, extracția în fază solidă (SPE) sau SPME, urmată de determinare gaz cromatografică sau lichid cromatografică cu spectrometria de masă (GC-MS) [4-6].

În țară, după informațiile noastre, nu s-a utilizat sau aplicat o metoda analitică pentru determinarea hormonilor steroidieni (estronă și β -estradiol) în probe biologice (ser) prin tehnica DI-SPME-GC-MS cu derivatizare cu MSTFA.

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. În general, agentul de derivatizare cel mai folosit este bis(trimetilsilil) trifluoroacetamidă (BSTFA), însă compușii derivatizați cu MSTFA sunt mult mai volatili decât cei derivatizați cu BSTFA, de aceea în metoda propusă am utilizat MSTFA.

Scopul prezentei invenții este elaborarea unei metode analitice de determinare a hormonilor steroidieni (estronă și β -estradiol) în matrice biologică (ser

Descrierea invenției

din sânge), prin extracție SPME, urmată de derivatizarea analiților cu MSTFA și detecție simultană prin gaz cromatografie capilară cuplată cu spectrometrie de masă.

Problemele tehnice pe care le rezolvă invenția sunt:

- metoda de microextracție în fază solidă pe fibră polimerică specifică permite extracția specifică a analiților, fără interferențe de matrice, nu necesită utilizarea solvenților organici toxici, permite obținerea unor limite de detecție extrem de scăzute, are mare potențial pentru analize efectuate la locul recoltării, este rapidă deoarece integrează într-o singură etapă extracția, concentrarea, purificarea și evaporarea probei;
- derivatizarea cu MSTFA permite obținerea compușilor mult mai volatili decât cei derivatizați cu BSTFA, iar derivatizarea pe fibra polimerică în headspace-ul probei elimină contaminarea fibrei cu matricea probei, eliminând efectele de matrice;
- separarea, identificarea, detecția și cuantificarea analiților se realizează simultan prin GC-MS pe coloană capilară nepolară, astfel încât metoda analitică propusă de determinare a hormonilor steroidieni (estronă și β -estradiol) în probe biologice (ser din sânge) este economică, rapidă, foarte versatilă, extrem de sensibilă și selectivă și permite analiza unor volume reduse de probe de apă, eliminând complet utilizarea solvenților organici toxici.

Metoda propusă permite determinarea unor hormoni naturali (estronă și β -estradiolul) din probe cu matrice biologică. Metoda folosită la extracția analiților din probe este microextracția în fază lichidă (SPME) prin imersarea directă în probele de ser, sililarea pe fibră, urmată de determinare simultană 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 biologică.

Probele de sânge de la animale se recoltează cu ajutorul unei seringi care conține heparină (10 mg/ml heparină în 0,9% NaCl). Serul se separă de plasmă prin centrifugare timp de 10 minute la 5000 rpm, și se stochează la -20°C.

Descrierea invenției

Deoarece serul din sânge este o matrice complexă ce conține dizolvate proteine, glucoză, ioni minerali și lipide este necesară o etapă de extracție, pentru îndepărtarea compușilor secundari. Pretratamentul probelor de ser este necesar înainte de imersarea fibrei direct în ser și se efectuează prin extracție lichid-lichid cu dietileter, urmată de evaporare la sec. Reziduul se redizolvă în metanol.

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

Un volum V de ser se introduce într-un flacon prevăzut cu septum și agitator magnetic pentru agitare. Se adaugă NaCl pentru scăderea solubilității estrogenilor. Fibră de PA se introduce prin septum în flaconul cu proba de ser, iar extracția are loc la 25...45°C, timp de 100...120 minute, într-o baie de apă termostată, apoi fibra se retrage în ac.

După extracție, analiții se derivatizează prin expunerea fibrei în vapori de $V \mu\text{l}$ MSTFA, timp de 60...100 min. la 25...45°C, în headspace.

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. Coloana capilară nepolară utilizată este de tipul HP-5MS, 30 m \times 0,25 mm \times 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 siliilați ai hormonilor steroidieni analizați: 342 și 416 pentru estronă și respectiv pentru β -estradiol.

Extracția hormonilor estrogeni (estronă și β -estradiol) din probe de ser cu tehnica SPME, urmată de derivatizarea lor cu MSTFA, anterior separării, identificării și detecției cu GC-MS este o procedură analitică simplă și rapidă, capabilă să analizeze volume reduse de probe apoase, cu sensibilitate și precizie ridicate.

Parametrii de performanță ai metodei de determinare a estronei și β -estradiolului din ser (DI-SPME-GC-MS) sunt:

Descrierea invenției

- limitele de detecție pentru estronă și β -estradiol: 0,068 $\mu\text{g/l}$, respectiv 0,020 $\mu\text{g/l}$;
 - gradele de recuperare pentru estronă și β -estradiol: 95%, respectiv 90%.
1. 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.
 2. Ouyang, G., Pawliszyn, J., Recent developments in SPME for on-site analysis and monitoring, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 25, **2006**, 692-703.
 3. Noppe, H., Bizec, B.L., Verheyden, K., Brabander, H.F.D., Novel analytical methods for the determination of steroid hormones in edible matrices, *Analytica Chimica Acta*, **2008**, 611, 1–16.
 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. Yang, L., Luan, T., Lan, C., Solid-phase microextraction with on-fiber silylation for simultaneous determinations of endocrine disrupting chemicals and steroid hormones by gas chromatography–mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1104 (1-2), **2006**, 23-32

Revendicare

REVENDICARE

Metodă de determinare a hormonilor steroidieni în matrice biologică (ser), 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 β -estradiol) în probe biologice (ser) prin tehnica DI-SPME-GC-MS cu derivatizare cu MSTFA, prin microextracția în fază lichidă (SPME) prin imersarea directă în probele de ser (fibră de PA se introduce prin septum în flaconul cu proba de ser, iar extracția are loc la temperatura de 25...45°C, timp de 100..120 minute), sililarea pe fibră (analiții se derivatizează prin expunerea fibrei în vapori de $V \mu\text{l}$ MSTFA, timp de 60...100 min. la 25...45°C, în headspace) urmată de determinare simultană a derivaților sililați prin gaz cromatografie cuplată cu spectrometria de masă.

Director ICIA,
CS II Mircea Chintoanu



DESENE

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

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

Director ICIA,
CS II Mircea Chintoanu



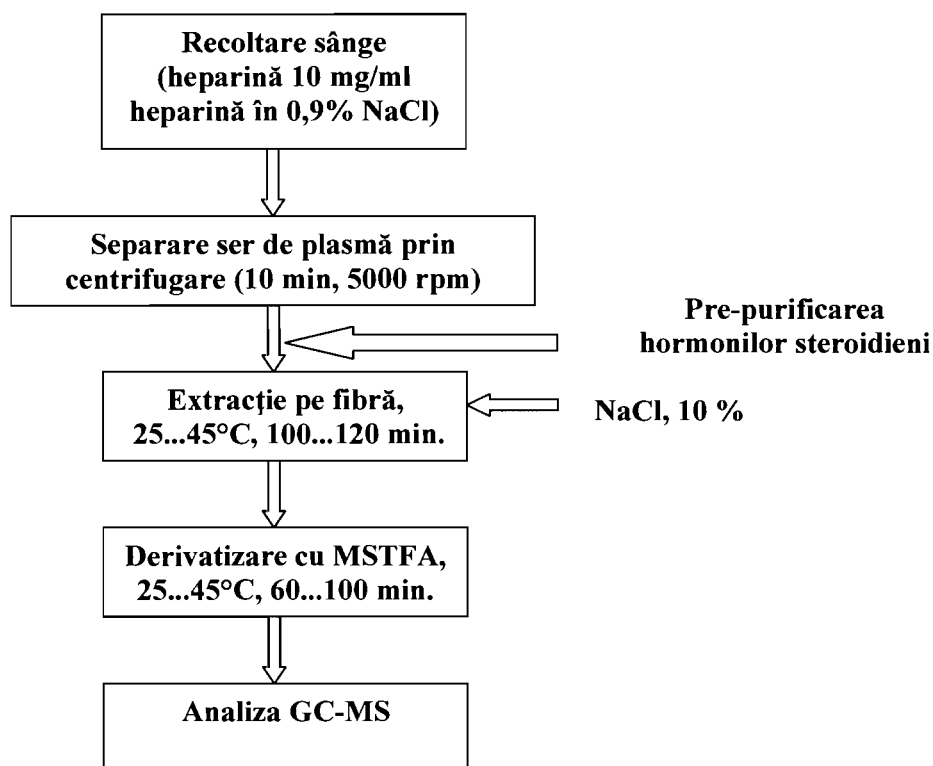



Figura 1. Etapele metodei analitice de determinare a hormonilor steroidieni în matrice biologică (ser), prin GC-MS, după microextracție în fază solidă (SPME) și derivatizare pe fibră



Director ICIA,
CS II Mircea Chintoanu

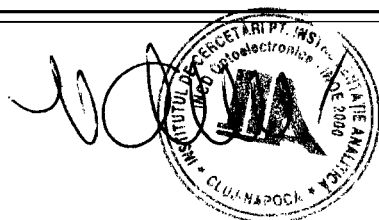
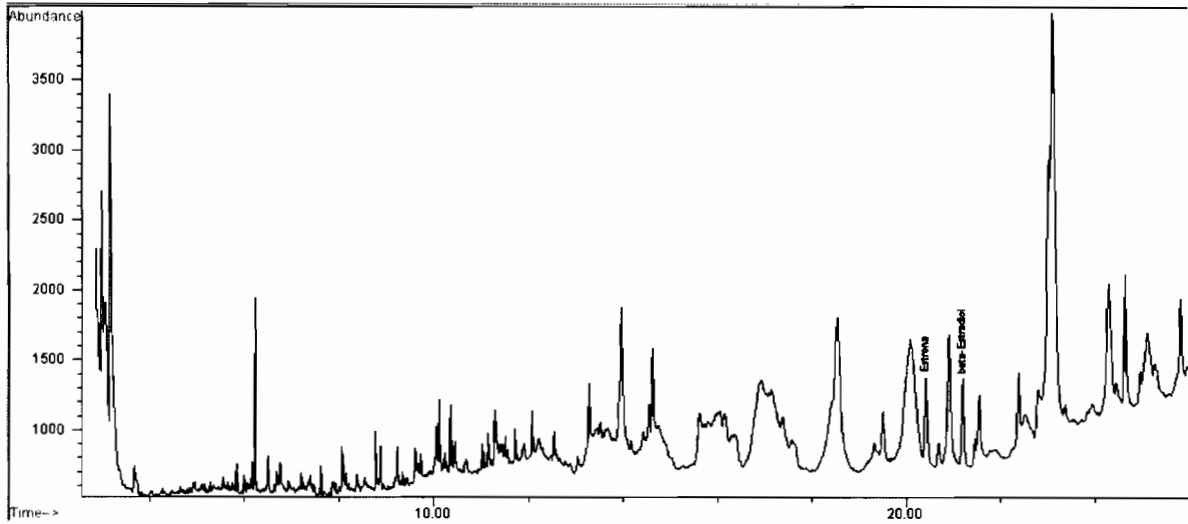


Figura 2. Cromatograma SIM a hormonilor steroidieni analizați din ser, după microextracție în fază solidă (SPME) și derivatizare pe fibră



Director ICIA,
CS II Mircea Chintoanu

