



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2011 00726**

(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 ÎN MATRICE BIOLOGICĂ**



1 Invenția se referă la o metodă analitică extrem de sensibilă și specifică, de determi-
3 nare 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
5 pe fibră în headspace cu N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamidă (MSTFA), și detecție
simultană, prin gaz cromatografie capilară, cuplată cu spectrometrie de masă (GC-MS).

7 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 alimen-
9 tației animalelor destinate producției de carne și/sau lapte, iar prin aceasta, a producțiilor
acestora. Aceste cantități de estrogeni pătrund, prin ingerarea cărnii și a produselor lactate
11 ale animalelor, direct în organismul uman, provocând efecte secundare ale hiperestrogen-
ismului atât la copii, cât și la adulți. Din cauza concentrațiilor extrem de scăzute în mediul
13 apos, sunt necesare metode de extracție și determinare foarte sensibile și precise (vezi
Neale, A. N., Escher, B. I., Schäfer, A. I., *pH dependence of steroid hormone-organic
15 matter interactions at environmental concentrations*, *Science of the Total
Environment*, **407**, 2009, 1167-1173; Ouyang G., Pawliszyn J., *Recent developments in
17 SPME for on-site analysis and monitoring*, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **25**,
2006, 692-703; Noppe H., Bizec B. L., Verheyden K., Brabander H. F. D., *Novel
19 analytical methods for the determination of steroid hormones in edible matrices*,
Analytica Chimica Acta, **2008**, **611**, 1-16).

21 În alte state se aplică metode analitice cuplate pentru extracția, detecția și cuantifica-
rea estronei și a β -estradiolului, cum sunt: extracția lichid-lichid, extracția în fază solidă (SPE)
23 sau SPME, urmată de determinare gaz cromatografică sau lichid cromatografică cu spec-
trometria de masă (GC-MS) (vezi Zhang Z., Duan H., Zhang L., Chen X., Liu W., Chen G.,
25 *Direct determination of anabolic steroids in pig urine by a new SPME-GC-MS method*,
Talanta, **78**, 2009, 1083-1089; Sebok A., Vasanits-Zsigrai A., Helenkar A., Zaray Gy.,
27 Molnar-Perl I., *Multiresidue analysis of pollutants as their trimethylsilyl derivatives, by
gas chromatography-mass spectrometry*, *Journal of Chromatography A*, **1216**, 2009,
29 2288-2301; 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
31 Chromatography A*, **1104** (1-2), 2006, 23-32).

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

35 Problema pe care o rezolvă invenția constă în în elaborarea unei metode de determi-
nare a hormonilor steroidieni estronă și β -estradiol în matrice biologică (ser din sânge), prin
37 extracție SPME, urmată de derivatizarea analiților cu MSTFA, și detecție simultană, prin gaz
cromatografie capilară, cuplată cu spectrometrie de masă.

39 Metoda conform invenției înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că se
recoltează proba de sânge, se separă serul de plasmă, apoi se supune etapei de micro-
41 extracție în fază solidă, cu imersarea directă a fibrei, în care se utilizează o fibră de poliacrilat
de 85 μ m, la temperatura de 100...120°C, timp de 25...45 min, urmată de derivatizarea
43 analitului în vapori de N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamidă, timp de 60...100 min, la tem-
peratura de 25...45°C, identificarea și cuantificarea simultană, prin gaz cromatografie
45 capilară, cuplată cu spectrometrie de masă.

Prin aplicarea invenției, se obțin următoarele avantaje:

47 - metoda de microextracție în fază solidă, pe fibră polimerică specifică, permite
extracția specifică a analiților, fără interferențe de matrice, nu necesită utilizarea solvenților
49 organici toxici, permite obținerea unor limite de detecție extrem de scăzute, are mare poten-
țial pentru analize efectuate la locul recoltării, este rapidă, deoarece integrează într-o singură
51 etapă extracția, concentrarea, purificarea și evaporarea probei;

RO 128665 B1

- 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 (estrona 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 determinarea simultană a derivaților sililați prin gaz cromatografie cuplată cu spectrometria de masă. N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (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 și 2, ce reprezintă:

- fig. 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;

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

Exemplul 1

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

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 min la 5000 rpm, și se stochează la -20°C . 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 cromatograf, timp de 2 h, 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. Fibra de PA se introduce prin septum în flaconul cu proba de ser, iar extracția are loc la $25\text{...}45^{\circ}\text{C}$, timp de $100\text{...}120$ min, într-o baie de apă termostată, apoi fibra se retrage în ac.

După extracție, analiții se derivatizează prin expunerea fibrei în vapori de 5 μl MSTFA, timp de $60\text{...}100$ min, la $25\text{...}45^{\circ}\text{C}$, în headspace.

RO 128665 B1

1 Analiza gaz cromatografică a hormonilor steroidieni din apă (identificarea și cuantifi-
3 carea) 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
5 utilizată este de tipul HP-5MS, 30 m x 0,25 mm x 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
7 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
9 3°C/min; de la 270 la 300°C, cu 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 β-estradiol.

11 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
13 GC-MS, este o procedură analitică simplă și rapidă, capabilă să analizeze volume reduse
de probe apoase, cu sensibilitate și precizie ridicate.

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

- 17
- limitele de detecție pentru estronă și β-estradiol: 0,068 μg/l, respectiv, 0,020 μg/l;
 - gradele de recuperare pentru estronă și β-estradiol: 95%, respectiv, 90%.

RO 128665 B1

Revendicare

1

Metodă de determinare a hormonilor steroidieni în matrice biologică, **caracterizată prin aceea că** se recoltează proba de sânge, se separă serul de plasmă, apoi se supune etapei de microextracție în fază solidă, cu imersarea directă a fibrei, în care se utilizează o fibră de poliacrilat de 85 μm, la temperatura de 100...120°C, timp de 25...45 min, urmată de derivatizarea analitului în vapori de N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamidă, timp de 60...100 min, la temperatura de 25...45°C, identificarea și cuantificarea simultană, prin gaz cromatografie capilară, cuplată cu spectrometrie de masă.

3

5

7

9

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01);

G01N 33/48 (2006.01)

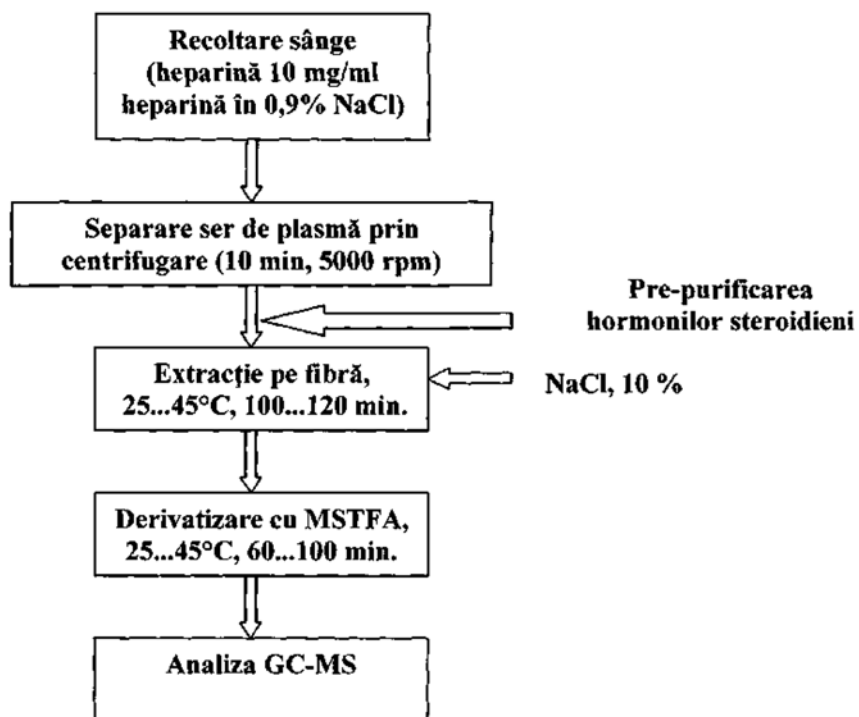


Fig. 1

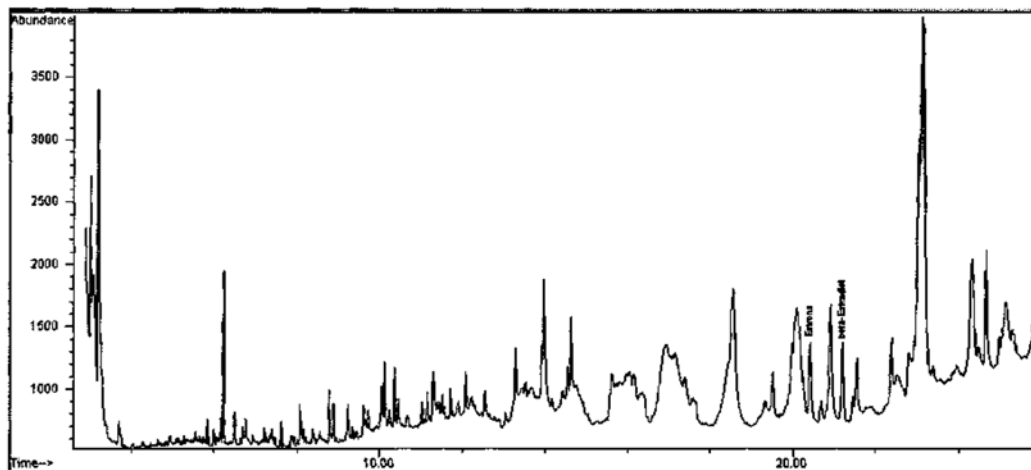


Fig. 2



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
 Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
 sub comanda nr. 280/2017