



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2013 00936**

(22) Data de depozit: **28/11/2013**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/07/2018** BOPI nr. 7/2018

(41) Data publicării cererii:
30/06/2015 BOPI nr. 6/2015

(73) Titular:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
ȘI DEZVOLTARE PENTRU FIZICĂ ȘI
INGINERIE NUCLEARĂ "HORIA
HULUBEI", STR. REACTORULUI NR.30,
MĂGURELE, IF, RO**

(72) Inventatori:
• **DOROBANȚU IOAN,
ALEEA CÂMPUL CU FLORI NR.1, BL.OD 2,
SC.C, AP.110, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;**

• **NEAGU LIVIA,
STR.ALEXANDRU LĂPUȘNEANU NR.81,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**J. KAUR ȘI AL., "DIRECT HAPTEN
COATED IMMUNOASSAY FORMAT FOR
THE DETECTION OF ATRAZINE AND 2,4-
DICHLOROPHENOXYACETIC ACID
HERBICIDES", ANALITICA CHIMICA ACTA
607, PP. 92-99, 2008; RO 116460 B1**

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A PRODUSULUI ACID
2,4-DICLOROFENOXI-AMIDOPROPILEN-AMIDO BIOTINĂ**



Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui marker utilizat în tehnica imunochimică, în fază omogenă, pentru dozarea pesticidului acid 2,4-diclorofenoxiacetic în probe biologice și de mediu.

În prezent sunt cunoscuți markeri enzimatici realizați prin cuplarea directă a pesticidului activat cu carbodiimida, utilizând enzime ca fosfataza alcalină, sau indirectă, ca peroxidaza, printr-o legare covalentă la o diamină ce formează o legătură între pesticid și proteină (enzima). Markerii enzimatici obținuți și utilizați în tehnicile imunochimice de dozare au mase moleculare mari și, în consecință, prezintă o cinetică de reacție lentă în reacție cu anticorpii antipesticid.

Problema tehnică pe care rezolvă invenția este de a furniza un marker care să poată fi utilizat în tehnica imunochimică, în fază omogenă, pentru dozarea pesticidului acid 2,4-diclorofenoxiacetic, în probe biologice și de mediu, și care să asigure un timp cât mai scurt de analiză a probei.

Procedeu de obținere a markerului biotinic acid 2,4-diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotină, conform invenției, constă în aceea că:

- se dizolvă 5 mg biotin-NHS în 1 ml dimetilsulfoxid, iar soluția rezultată se adaugă picătură cu picătură, sub agitare, la 4 ml soluție de 150 mg 1,3-diaminopropan dizolvat în tampon carbonat de sodiu 50 mM, $pH = 9,6$, se lasă să reacționeze timp de 3 h la temperatura camerei, pentru cuplarea diaminei la biotină, cu formarea derivatului biotin-amidopropilenamină, care este purificat pe coloană de Sephadex G-10, având ca eluent tamponul carbonat de sodiu 50 mM, $pH = 9,6$;

- se dizolvă 10 mg acid 2,4-diclorofenoxiacetic, 10 mg N-hidroxisuccinimidă și 30 mg 1-etil-3-(3'-diaminopropil)-carbodiimidă în 1 ml dimetilformamidă, timp de 3 h, la temperatura camerei, rezultând un amestec de pesticid activat;

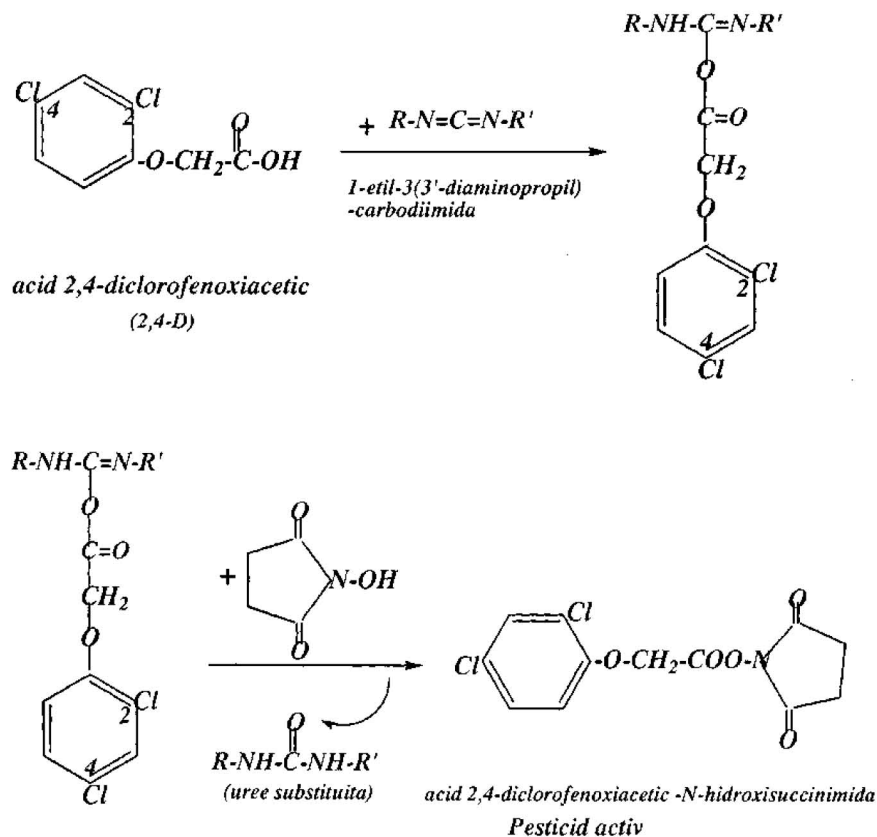
- se amestecă 2 ml din fracțiunea ce conține derivatul biotin-amidopropilenamină cu 0,5 ml soluție de pesticid activat, și se lasă să reacționeze sub agitare la temperatura camerei, timp de 3 h, iar produsul acid 2,4 diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotină obținut este separat pe coloană de Sephadex G-10, având ca solvent de eluție tampon fosfat 10 mM, $pH = 7,2$, și, în final, este purificat prin cromatografie în strat subțire pe silicagel G, extracție cu alcool etilic și centrifugare la $1500 \times g$ timp de 10 min, și depozitat la $-20^{\circ}C$, în vederea utilizării acestuia în tehnica imunochimică de dozare a pesticidului acid 2,4-diclorofenoxiacetic.

Avantajul produsului acid 2,4-diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotina, având masă moleculară mică, este acela că în reacția imună dintre pesticidul ce urmează a fi determinat și anticorpii omolog (anticorpii anti 2,4-D) prezintă o cinetică rapidă, un timp scurt pentru atingerea echilibrului chimic dintre componente față de markerii enzimatici sus menționați și, în consecință, un timp scurt de analiză a probei.

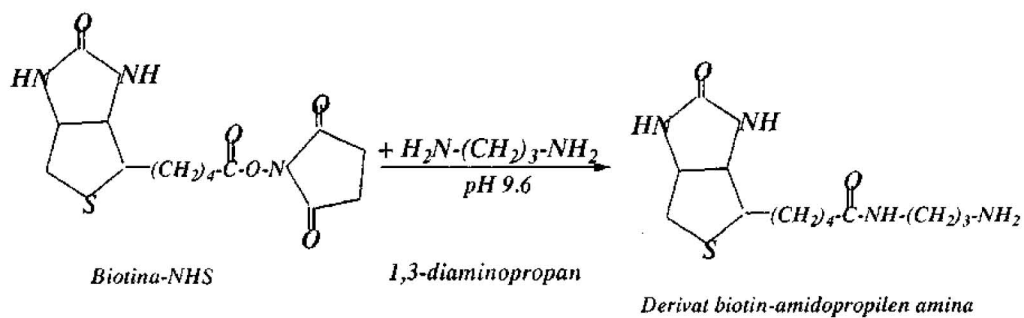
Procedeu conform invenției constă în aceea că 5 mg de biotin-NHS, dizolvată în 1 ml dimetilsulfoxid (DMSO), este introdusă picătură cu picătură, sub agitare continuă, peste 4 ml soluție de 1,3-diaminopropan 150 mg dizolvată în tampon carbonat de sodiu 50 mM, $pH = 9,6$. Amestecul sub agitare este lăsat să reacționeze timp de 3 h, iar produsul biotin-propilen amina se separă prin cromatografie pe coloana de Sephadex G-10 ($H = 30$ cm, $\Phi = 1$ cm), având ca eluent soluția de tampon carbonat 50 mM, $pH = 9,6$. Produsul biotin-propilen amina este utilizat la cuplare cu pesticidul acid 2,4-diclorofenoxiacetic activat cu carbodiimidă și N-hidroxisuccinimidă. Pentru activarea pesticidului, se dizolvă într-un volum de 1 ml de dimetil formamida (DMF) 10 mg acid 2,4-diclorofenoxiacetic, 10 mg N-hidroxisuccinimidă și 30 mg 1-etil-3-(3'-diaminopropil)-carbodiimidă, și se agită 3 h, în vederea activării grupării carboxi a pesticidului. În final 0,5 ml de soluție de pesticid activat în DMF se adaugă picătură cu picătură, sub agitare, la 2 ml soluție de biotin-propilen amina.

Amestecul se lasă timp de 3 h sub agitare la temperatura camerei, iar produsul obținut, acid 2,4-diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotina, se separă prin cromatografie pe coloana de Sephadex G10, iar fracțiunea ce conține produsul este purificată pe cromatografie în strat subțire de silicagel G având ca eluent amestecul benzemacetona 3:1 (V/V). Pudra de silicagel G care conține produsul se extrage cu alcool etilic, iar silicagelul este înlăturat prin centrifugare la 1500 xg, timp de 10 min. Produsul acid 2,4-diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotina în alcool etilic se depozitează la -20°C, în vederea utilizării acestuia în tehnica imunochimică de dozare a pesticidului acid 2,4-diclorofenoxiacetic. Procedul de obținere a markerului cu biotina constă în 6 etape, E1÷E6.	1 3 5 7 9
E1) <i>Activarea pesticidului acidului 2,4-diclorofenoxiacetic cu 1-etil-3(-3'-diaminopropil)-carbodiimidă</i>	11
O soluție de 10 mg acid 2,4-diclorofenoxiacetic (2,4-D), 10 mg N-hidroxisuccinimidă (NHS) și 30 mg 1-etil-3(-3'-diaminopropil)-carbodiimidă în 1 ml dimetilformamidă, și se agită 3 h, în vederea activării grupării carboxi a pesticidului.	13
E2) <i>Cuplarea biotinei-NHS cu 1,3-diaminopropan</i>	15
5 mg biotin-NHS se dizolvă în 1 ml dimetilsulfoxid (DMSO), iar soluția obținută se introduce picătură cu picătură, sub agitare, peste 4 ml soluție de 150 mg 1,3-diaminopropan dizolvat în tampon carbonat de sodiu 50 mM, pH = 9,6 iar reacția de cuplare se desfășoară pe o durată de 3 h, la temperatura camerei.	17 19
E3) <i>Purificarea derivatului biotin-amidopropilen amină</i>	
Amestecul de reacție obținut în etapa 2 este cromatografiat pe coloana de Sephadex G-10 (H = 30 cm, Φ = 1 cm), având ca eluent tampon carbonat de sodiu 50 mM, pH = 9,6.	21
E4) <i>Reacție de cuplare a pesticidului activat (E1) la biotin-amidopropilen amină</i>	23
0,5 ml soluție de pesticid activat, obținut în etapa 1, este introdusă picătură cu picătură sub agitare peste 2 ml soluție de biotin-propilen amina obținut în etapa 3. Reacția de cuplare a pesticidului la biotin-propilen amină se desfășoară pe o perioadă de 3 h, la temperatura camerei.	25 27
E5) <i>Separarea produsului acid 2,4-diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotină pe Sephadex G-10</i>	29
Amestecul de reacție rezultat în etapa 4 este cromatografiat pe coloana de Sephadex G-10, iar eluentul este tampon fosfat de sodiu 10 mM, pH = 7,2.	31
E6) <i>Purificarea compusului acid 2,4-diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotină</i>	33
Fracțiunea ce conține produsul acid 2,4-diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotina, rezultat în etapa 5, este cromatografiat pe cromatografie în strat subțire de silicagel G, având ca eluent amestecul benzen:acetonă 3:1 (V/V). După uscarea plăcii, pudra din zona ce conține produsul este extrasă cu alcool etilic, iar silicagelul este îndepărtat prin centrifugare la 1500 x g, timp de 10 min. Produsul purificat se depozitează în alcool etilic la temperatura de -20°C, în vederea utilizării.	35 37
	39

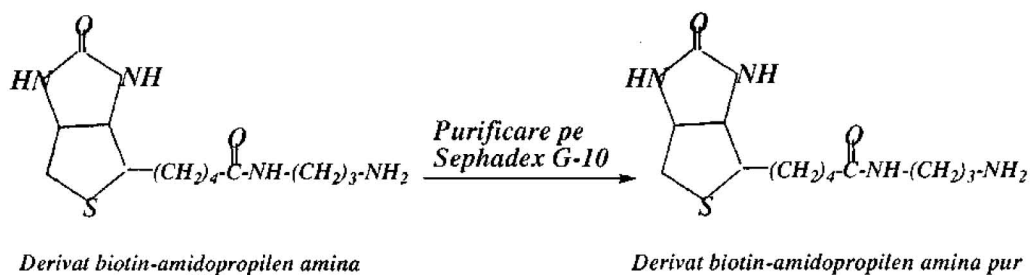
E1. Activarea pesticidului acid 2,4-diclorofenoxiacetic cu 1-etil-3(3'-diaminopropil)-carbodiimidă



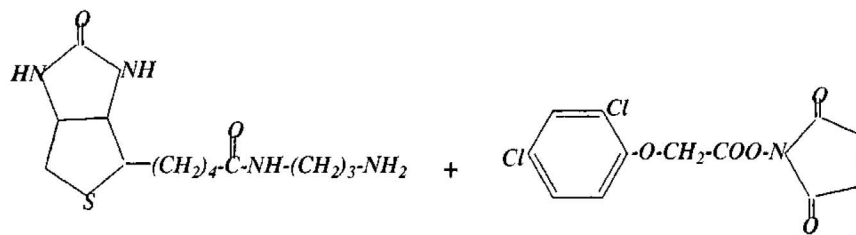
E2. Cuplarea biotinei-NHS cu 1,3-diaminopropan



E3. Purificarea derivatului biotin-amidopropilen amină

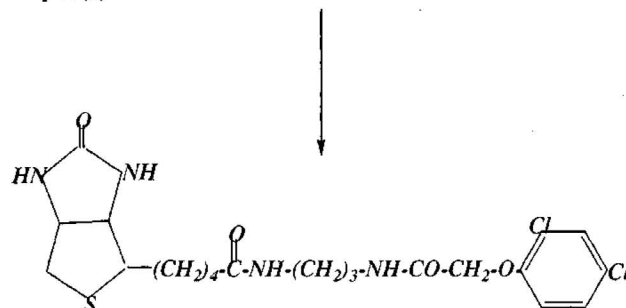


E4. Reacția de cuplare a pesticidului activat (E1) la biotin-amidopropilen amină



Derivat biotin-amidopropilen amina
(Soluție în carbonat de sodiu 50 mM
pH9,6)

Acid 2,4-diclorofenoxiacetic-NHS
(soluție în dimetil formamida)



acid 2,4-diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotina

E5. Separarea produsului acid 2,4-diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotină pe Sephadex G10

acid 2,4 diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotina

Separare produs pe
Sephadex G-10

acid 2,4 diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotina

E6. Purificarea compusului acid 2,4-diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotină

acid 2,4-diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotina

Purificare pe
Silicagel G,
extracție în alcool etilic

acid 2,4-diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotina

1

Revendicare

3

Procedeu de obținere a markerului biotinic acid 2,4-diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotină, **caracterizat prin aceea că:**

5

- se dizolvă 5 mg biotin-NHS în 1ml dimetilsulfoxid, iar soluția rezultată se adaugă picătură cu picătură, sub agitare, la 4 ml soluție de 150 mg 1,3-diaminopropan dizolvat în tampon carbonat de sodiu 50 mM, $pH = 9,6$, se lasă să reacționeze timp de 3 h la temperatura camerei, pentru cuplarea diaminei la biotină, cu formarea derivatului biotin-amidopropilen-amină, care este purificat pe coloană de Sephadex G-10, având ca eluent tamponul carbonat de sodiu 50 mM, $pH = 9,6$;

11

- se dizolvă 10 mg acid 2,4-diclorofenoxiacetic, 10 mg N-hidroxisuccinimidă și 30 mg 1-etil-3-(3'-diaminopropil)-carbodiimidă în 1 ml dimetilformamidă, timp de 3 h, la temperatura camerei, rezultând un amestec de pesticid activat;

13

15

- se amestecă 2 ml din fracțiunea ce conține derivatul biotin-amidopropilen-amină cu 0,5 ml soluție de pesticid activat, și se lasă să reacționeze sub agitare la temperatura camerei, timp de 3 h, iar produsul acid 2,4 diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotină obținut este separat pe coloană de Sephadex G-10, având ca solvent de eluție tampon fosfat 10 mM, $pH = 7,2$, și, în final, este purificat prin cromatografie în strat subțire pe silicagel G, extracție cu alcool etilic și centrifugare la $1500 \times g$, timp de 10 min, și depozitat la $-20^{\circ}C$, în vederea utilizării acestuia în tehnica imunochimică de dozare a pesticidului acid 2,4-diclorofenoxiacetic.

17

19

21



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 334/2018