



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2008 00942**

(22) Data de depozit: **27.11.2008**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29.04.2011** BOPI nr. 4/2011

(41) Data publicării cererii:  
**30.06.2010** BOPI nr. 6/2010

(73) Titular:  
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU  
FIZICĂ ȘI INGINERIE NUCLEARĂ "HORIA  
HULUBEI", STR. AȚOMIȘTILOR NR. 407,  
PO BOX MG-6, MĂGURELE, IF, RO**

(72) Inventatori:  
• **DOROBANȚU IOAN,  
ALEEA CÂMPUL CU FLORI NR. 1, BL. OD2,  
SC. C, AP.110, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,  
RO;**  
• **HARANGUS LIVIA,  
STR. ALEXANDRU LĂPUȘNEANU NR.81,  
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**B.S. Clegg, G.R. Stephenson, J.C. Hall,  
"Development of an Enzyme-Linked  
Immunosorbent Assay for the Detection of  
Dicamba", J. Agric. Food Chem., 49(5),  
pp.2168-2174, Ontario, Canada, May 2001;  
J.W. Roy, J.C. Hall, G.W. Parkin,  
C.Wagner-Riddle, B.S. Clegg, "Seasonal  
Leaching and Biodegradation of Dicamba  
in Turfgrass", Journal Environmental  
Qual., Vol.30, pp. 1360-1370, Ontario,  
Canada, 2001.**

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A MARKERULUI ENZIMATIC  
ACID 3,6-DICLORO-2-METOXI BENZOIL-  
HEXAMETILENDIAMIN-GLUTARALDEHID-FOSFATAZĂ  
ALCALINĂ**



# RO 125536 B1

1 Inventția se referă la procedeul de obținere a markerului enzimatic acid 3,6-dicloro-2-  
2 metoxi benzoic-fosfatază alcalină, utilizat în tehnica ELISA, pentru dozarea pesticidului acid  
3 3,6-dicloro-2-metoxi benzoic din probe biologice și de mediu.

4 Clegg, B.S. G.R. Stephenson, J.C. Hall, în lucrarea *Development of an Enzyme-*  
5 *Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Dicamba* J, Agric. Food Chem., 2001 May,  
6 49(5), 2168-2174, au prezentat markeri enzimatici pentru detectarea pesticidelor în probele  
7 din mediu prin legarea anticorpilor antidicamba la peroxidază.

8 Roy J. W., J. C. Hall, G. W. Parkin, C.W.Riddle, B.S. Clegg, *Seasonal leaching and*  
9 *biodegradation of dicamba in turfgrass*, Journal Environmental Qual., 2001, 30, 1360-1370,  
10 care se referă la utilizarea dicamba în agricultură, iar toxicitatea acestuia determină nevoia  
11 de monitorizare a probelor din mediu. Pentru urmărirea prezenței pesticidului în mediul  
12 inconjurător, se folosesc metodele analitice, cum ar fi cromatografie lichidă de înaltă  
13 performanță (HPLC), cromatografie în fază apoasă sau spectrometrie UV.

14 Markeri enzimatici, obținuți prin procedurile prezentate mai sus, realizați prin cuplarea  
15 directă a pesticidului cu enzima prin activare cu ajutorul carbodiimidei, prezintă dezavantajul  
16 că procedura de cuplare conduce la o scădere a activității enzimatice specifice a markerului,  
17 iar legătura peptidică formată dintre pesticid și enzimă este prea mică, fapt ce conduce la o  
18 afinitate scăzută a markerului enzimatic cu anticorpus omolog în tehnica ELISA de dozare  
19 a pesticidului.

20 Problema pe care o rezolvă invenția constă în obținerea unui marker enzimatic cu o  
21 activitate enzimatică mare, pentru detectarea pesticidului respectiv din probe biologice din  
22 mediu.

23 Procedeul de obținere a markerului enzimatic acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoil-  
24 hexametilendiamin-glutardehid-fosfatază alcalină, conform invenției, înlătură dezavantajele  
25 de mai sus, prin aceea că se dizolvă 50 mg acid 3,6-dicloro-2-metoxi benzoic, 100 mg N-  
26 hidroxisuccinimidă și 100 mg carbodiimidă în 2 ml dimetilformamidă și se agită amestecul  
27 care a fost activat cu o soluție de 10 mg de hexametilendiamină în tampon carbonat de sodiu  
28 50 mM, pH 9,6 și este lăsat să reacționeze timp de 4 h, apoi se supune cromatografiei pe  
29 Silicagel tip G, se iau 100 μl de soluție astfel purificată de concentrație 1 mg/ml în tampon  
30 fosfat 10 mM la pH 8 și 100 μl fosfatază alcalină de concentrație 10 mg/ml sunt amestecate  
31 cu o soluție de glutaraldehidă 0,1% și sunt lăuate să reacționeze timp de 2 h, reacția este  
32 apoi oprită prin adăugarea a 50 μl soluție de glicină de concentrație 100 mg/ml în tampon  
33 fosfat pH 8, urmat de cromatografia amestecului de reacție pe Sephadex G25, obținându-se  
34 markerul enzimatic purificat, care este depozitat la -18°C.

35 Procedeul conform invenției prezintă următoarele avantaje:

36 - prin utilizarea hexametilendiaminei și glutaralhidei, distanța dintre pesticidul cuplat  
37 la enzimă este mare comparativ cu metoda de legare directă a grupării carboxi a pesticidului  
38 de grupările amino libere ale enzimei descrisă în literatura de specialitate, acest fapt  
39 conducând la o afinitate mai mare a markerului enzimatic față de anticorpus antipesticidic în  
40 metoda ELISA și respectiv la o sensibilitate mai bună a tehnicii;

41 - în plus, se evită inactivarea parțială a enzimei prin mediul de reacție utilizat la  
42 metoda directă.

43 Procedeul conform invenției constă în aceea că 50 mg acid 3,6-dicloro-2-metoxi  
44 benzoic, 100 mg N-hidroxisuccinimida (NHS) și 100 mg 1-etil-3(-3'-diaminopropil)-carbo-  
45 diimida în 2 ml dimetilformamidă (DMF) se agită 4 h, în vederea activării grupării carboxi a  
46 pesticidului. Amestecul activat se introduce peste o soluție de 10 mg hexametilendiamină în  
47 1 ml tampon carbonat de sodiu 50 mM, pH 9,6 și este lăsat să reacționeze timp de 4 h, în  
48 vederea cuplării diaminei la pesticid. Derivatul pesticidic se purifică prin cromatografie pe

# RO 125536 B1

Silicagel tip G, 100 µl de soluție de acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoil-CO-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub> 1 mg/ml și 100 µl soluție de fosfatază alcalină 10 mg/ml în tampon fosfat 10 mM pH 8 sunt amestecate cu 50 µl soluție de glutaraldehidă 0,1% și lăsate să reacționeze timp de 2 h, după care reacția de cuplare este oprită prin adaosul de 50 µl soluție de glicină 100 mg/ml. Markerul enzimatic realizat este purificat prin cromatografie pe Sephadex G25 și se depozitează la -18°C, în vederea utilizării în tehnica ELISA de dozare pesticidică. Procedul de obținere a markerului enzimatic constă în patru etape EKE4.

**E1. Activarea acid 3,6-dicloro-2-metoxi benzoic:** O soluție de 50 mg pesticid acid 3,6-dicloro-2-metoxi benzoic, 100 mg N-hidroxisuccinimidă și 100 mg 1-etil-3-(3'-dimetil aminopropil)-carbodiimidă în 2 ml dimetilformamidă sunt agitate timp de 4 h, pentru activarea grupării carboxi a pesticidului.

**E2. Cuplarea acidului 3,6-dicloro-2-metoxi benzoic la hexametilen diamină:** Se dizolvă 10 mg hexametilendiamină în 1 ml tampon carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6. În soluția de hexametilendiamină se introduce sub agitare continuă amestecul activat rezultat la etapa E1. Reacția de cuplare a pesticidului cu diamina se continuă timp de 4 h, după care pH-ul soluției rezultate se ajustează la pH 8, cu ajutorul soluției de HCl 1N. Produsul acid 3,6-dicloro-2-metoxi benzoil-hexametilen amină se purifică prin cromatografie în strat subțire pe Silicagel tip G și se depozitează în tampon fosfat 10 mM pH 8, în vederea cuplării cu enzima.

**E3. Cuplarea acid 3,6-dicloro-2-metoxi benzoil-CO-NH-hexametilen-amina de fosfatază alcalină:** 100 µl soluție de acid 3,6-dicloro-2-metoxi benzoil-CO-NH-hexametilen-amina de concentrație 1 mg/ml în tampon fosfat 10 mM pH 8 se amestecă cu 100 µl fosfatază alcalină de concentrație 10 mg/ml având activitatea specifică 1000 U/mg. În amestecul de reacție format se introduc 50 µl soluție de glutaraldehidă 0,1% în tampon fosfat pH 8. Reacția de cuplare a derivatului pesticidic cu enzima se desfășoară sub agitare timp de 2 h, la temperatura camerei. Reacția se stopează apoi prin adaos în amestecul activat a 50 µl soluție de glicină 100 mg/ml în tampon fosfat 10 mM pH 8.

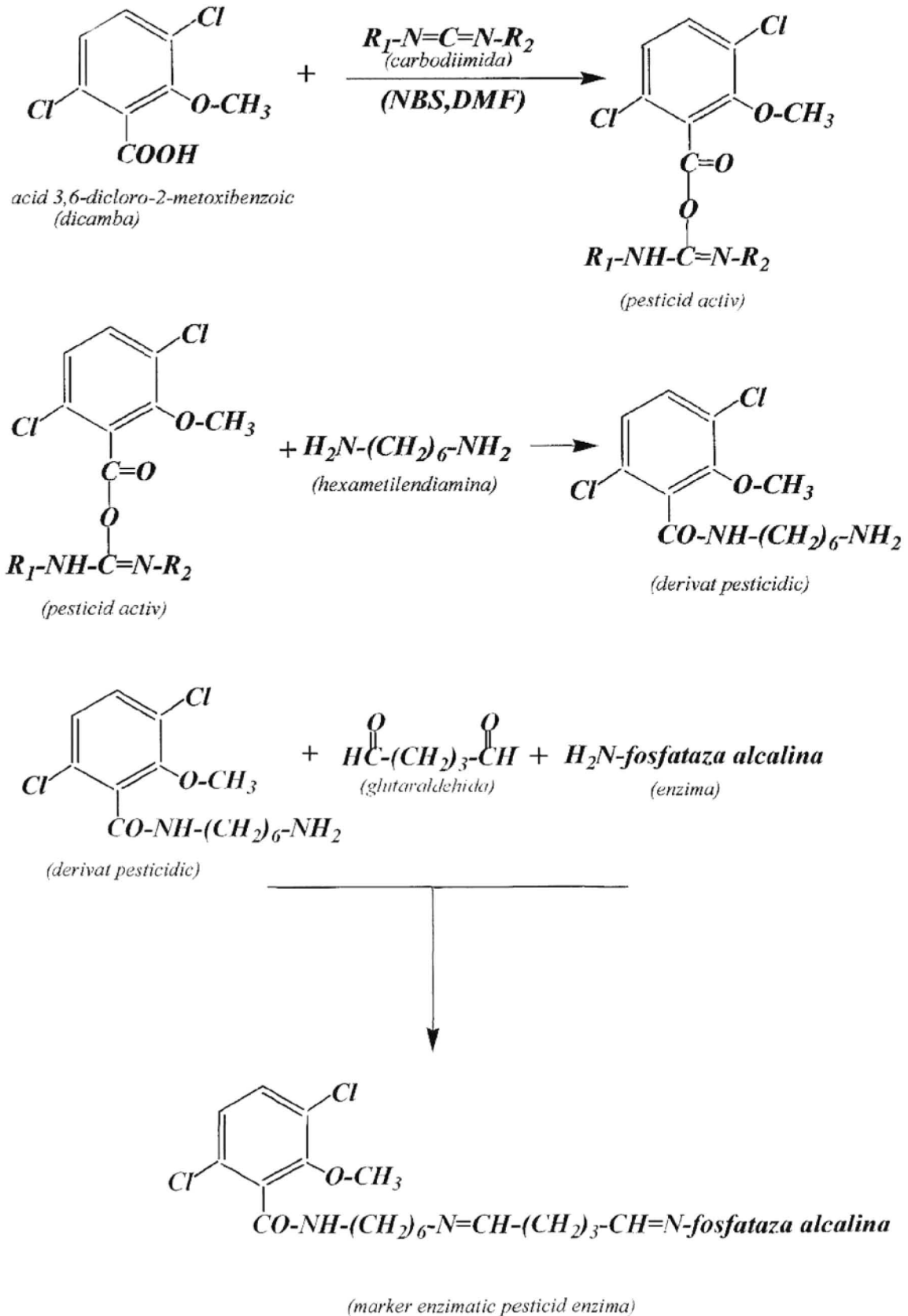
**E4. Purificarea markerului enzimatic pesticid-enzimă:** Amestecul de reacție rezultat la etapa E3 se cromatografiază pe coloana de Sephadex G25, având ca eluent tamponul fosfat 10 mM, iar fracțiunea cu produsul purificat este depozitată la -18°C, în vederea utilizării în tehnica ELISA de dozare pesticidică.

În continuare, se prezintă un exemplu de aplicare a procedurii.

**Exemplu.** 50 mg de acid 3,6-dicloro-2-metoxi benzoic, 100 mg N-hidroxisuccinimida (NHS) și 100 mg 1-etil-3-(3'-diaminopropil)-carbodiimida în 2 ml dimetil formamida (DMF) se agită 4 h, în vederea activării grupării carboxi a pesticidului. Amestecul activat se adaugă sub continuă agitare peste o soluție de 10 mg hexametilendiamină în tampon carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6 și lăsat să reacționeze timp de 4 h, în vederea cuplării diaminei la pesticid. Derivatul pesticidic se purifică prin cromatografie pe Silicagel tip G și 100 µl de soluție de derivat pesticidic purificat acid 3,6-dicloro-2-metoxi benzoil-CO-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub> și 100 µl soluție de fosfatază alcalină 10 mg/ml în tampon fosfat 10 mM pH 8 sunt amestecate cu o soluție de glutaraldehidă 0,1% și lăsate să reacționeze timp de 2 h, reacția fiind stopată prin adaos de 50 µl soluție de glicină 100 mg/ml. Markerul enzimatic obținut este purificat prin cromatografie pe Silicagel G25 și se depozitează la -18°C, în vederea folosirii în tehnica ELISA de dozare pesticidică.

# RO 125536 B1

1 Reacții chimice de obținere a markerului enzimatic acid 3,6-dicloro-2-metoxi benzoil-  
hexametilendiamin-glutaraldehyd-fosfatază alcalină:



# RO 125536 B1

## Revendicare

	1
Procedeu de obținere a markerului enzimatic acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoil-hexametilendiamin-glutardehid-fosfatază alcalină, <b>caracterizat prin aceea că se dizolvă</b> 50	3
părți în greutate acid 3,6-dicloro-2-metoxi benzoic, 100 părți în greutate N-hidroxisuccinimidă	5
și 100 părți în greutate carbodiimidă, în 2 părți, în volum, dimetilformamidă și se agită	
amestecul care a fost activat cu o soluție de 10 părți, în greutate, de hexametildiamină în	7
tampon carbonat de sodiu 50 mM, pH 9,6 și este lăsat să reacționeze timp de 4 h, apoi se	
supune cromatografiei pe Silicagel tip G, se iau 0,1 părți, în volum, de soluție astfel purificată	9
de concentrație 1 mg/ml în tampon fosfat 10 mM la pH 8 și 0,1 părți, în volum, fosfatază	
alcalină de concentrație 10 mg/ml sunt amestecate cu o soluție de glutaraldehidă 0,1% și	11
sunt lăsate să reacționeze timp de 2 h, reacția este apoi oprită prin adăugarea a 0,05 părți,	
în volum, soluție de glicină de concentrație 100 mg/ml în tampon fosfat pH 8, urmat de	13
cromatografia amestecului de reacție pe Sephadex G25, obținându-se markerul enzimatic	
purificat, care este depozitat la -18°C.	15



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM  
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci