



(11) **RO 128870 B1**

(51) **Int.Cl.**

**G01N 33/531** (2006.01),

**G01N 33/543** (2006.01),

**G01N 33/68** (2006.01),

**G01N 33/552** (2006.01)

(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2011 01408**

(22) Data de depozit: **16/12/2011**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/12/2015** BOPI nr. **12/2015**

(41) Data publicării cererii:  
**30/09/2013** BOPI nr. **9/2013**

(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:  
**RO 127570 A2; RO 122696 B1;  
RO 123130 B1; I. DOROBANȚU, M.RADU,  
L.HĂRĂNGUȘ, D.I.COROL,  
"SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION  
OF THE ENZYMIC MARKER  
NANDROLONE-3-  
CARBOXYMETHYLOXIME-ALKALINE  
PHOSPHATASE TO BE USED IN ELISA  
TECHNIQUE FOR ASSAYS OF  
NANDROLONE FROM BIOLOGICAL  
SAMPLES", ROMANIAN J.BIOPHYS.,  
VOL.17, PP.45-54, BUCHAREST, 2007**

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A NANOIMUNOSORBENTULUI  
NANOPARTICULĂ DE BIOXID DE SILICIU-AMINOPROPIL-  
TRITOXISILAN-GLUTARALDEHID-OVALBUMINĂ-  
TRENOLONĂ UTILIZAT ÎN TEHNICA ELISA DE DOZARE A  
TRENOLONEI**



# RO 128870 B1

1           Invenția se referă la un procedeu de obținere a nanoimunisorbentului nanoparticulă de  
bioxid de siliciu-aminopropiltriectoxisilan-glutaraldehyd-ovalbumina-trenbolonă ((SiO<sub>2</sub>)-(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O)<sub>3</sub>Si-  
3 C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>-N=CH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH=N-ovalbumina-C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>O<sub>2</sub>), utilizat în tehnica ELISA (engleză: Enzyme  
Linked Immunosorbent Assay) de dozare a steroidului trenbolonei (17β-hidroxiestra-4,9,11-  
5 trien-3-ona) din probe biologice. În prezent, sunt cunoscute pe plan mondial tehnici ELISA de  
dozare a steroizilor, ce utilizează, în principal, ca imunisorbent, faze solide, tip mase plastice,  
7 ce fixează, prin adsorbție fizică, la suprafață, antigenul sau anticorpul. Dezavantajul acestor  
metode este suprafață limitată și desorbția componentelor imune în procesul de dozare, putând  
9 conduce la scăderea sensibilității, respectiv, a acurateții analizei.

11           **RO 122696 B1** descrie un procedeu de obținere de imunisorbenți sferici bioxid de  
siliciu-3-carboximetil-nandrolona prin tratarea unor sfere de sticlă cu diametrul de 6 mm cu  
HNO<sub>3</sub> 10% la 60°C, apoi cu o soluție de α aminopropiltriectoxisilan 10%, pentru 3 h la 70°C,  
13 urmată de suspendare în soluție de dioxan și apă, și tratare cu nandrolonă-3-CMO.

15           **RO 123130 B1** se referă la un procedeu de obținere a imunisorbentului trenbolon-3-car-  
boximetiloxim-ovalbumin-carboximetil-celuloză, care cuprinde obținerea ovalbumin-carboximetil-  
17 celulozei prin reacția dintre CM-celuloză, NHS și carbodiimidă în DMF, urmată de cuplarea cu  
ovalbumină și, respectiv, cuplarea trenbolon-3-CMO la conjugatul ovalbumin-carboximetil-  
celuloză.

19           În lucrarea științifică Dorobanțu I, Radu M., Hărăngu L., Corol D. I, "**Synthesis and  
21 characterization of the Enzymatic Marker Nandrolone-3-Carboxymethyloxime-Alkaline  
Phosphatase to be used in Elisa Technique for Assays of Nandrolone from Biological  
23 Samples**", Romanian J. Biophys., 2007, Vol. 17, Nr. 1, pp. 45-54, se specifică că nandrolon-  
3-carboximetil oxima poate fi preparată prin condensarea nadrolonei cu acid aminooxicetic prin  
refluxare în etanol în prezență de NaOH.

25           Problema tehnică pe care își propune să o rezolve invenția este de a asigura obținerea  
unui imunisorbent care să poată fi utilizat în tehnica ELISA, pentru a doza trombolona din probe  
27 biologice și care să permită o îmbunătățire a sensibilității, respectiv, a acurateții acestui tip de  
analiză.

29           Procedeu de obținere a nanoimunisorbentului nanoparticulă de bioxid de siliciu-amino-  
propil-triectoxisilan-glutaraldehyd-ovalbumină-trenbolonă, conform invenției, cuprinde următoarele  
31 etape:

33           a) tratarea a 2 g de nanoparticule de SiO<sub>2</sub> de mărime Φ = 14 nm și arie 200 m<sup>2</sup>/g cu o  
soluție de HNO<sub>3</sub> 10%, timp de 1 h, urmată de incubarea cu α aminopropiltriectoxisilan 10% în  
35 apă distilată, pentru 3 h, la 70°C, urmată de spălarea cu 30 ml apă distilată de 3 ori și 20 ml  
alcool etilic o dată, cu îndepărtarea supernatantului prin centrifugare la 1500xg, timp de 10 min,  
urmată de tratarea nanoparticulelor, în vederea activării, cu 50 ml soluție de glutaraldehydă 0,1%  
37 în apă distilată, sub agitare continuă, la temperatura de 35°C, supernatantul fiind îndepărtat prin  
centrifugare la 1500xg, timp de 15 min;

39           b) obținerea trenbolon-3-carboximetil oximei prin dizolvarea de trenbolonă și acid  
oxiaminoacetic, în raport în greutate de 1:1, în alcool etilic, aducerea soluției rezultate la pH  
41 alcalin prin adăugare de NaOH 10% și refluxarea acesteia timp de 5 h, urmată de concentrare  
prin evaporare sub vid, diluare cu apă, extracție cu eter etilic, acidularea soluției apoase alcaline  
43 cu HCl concentrat, urmată de colectarea și uscarea precipitatului;

45           c) punerea în reacție a 100 mg trenbolon-3-carboximetil oximă cu 50 mg N-hidroxi-  
succinimidă și 200 mg carbodiimidă în 3,5 ml dimetilformamidă, timp de 4 h sub agitare, urmată  
47 de cuplarea ovalbuminei de trenbolona activată, prin adaosul de 2 ml din amestecul activat de  
trenbolonă la 8 ml soluție de ovalbumină 20 mg/ml în tampon carbonat de sodiu 50 mM,  
pH 9,6, reacție ce se desfășoară timp de 24 h, conjugatul imunogen rezultat, trenbolon-  
49 ovalbumină, fiind apoi purificat prin cromatografie pe coloană de Sephadex G25, având ca  
solvent de eluție tampon fosfat 50 mM, pH 7,24;

# RO 128870 B1

d) adăugarea conjugatului imunogen trenbolon-ovalbumină purificat de concentrație 2 mg/ml în apă distilată la nanoparticulele activate cu glutaraldehidă și suspendate în tampon fosfat 50 mM, pH 8,6, sub agitare, timp de 2 h, urmată de centrifugare la 1500xg, timp de 15 min, cu îndepărtarea supernatantului, iar apoi precipitatul nanoparticule de imunosorbent rezultat se spală de 3 ori cu tampon fosfat 50 mM, pH 8,6, iar particulele de imunosorbent bioxid de siliciu-aminopropiltriethoxisilan-glutaraldehid-ovalbumină-trenbolonă, obținute în urma centrifugării, se depozitează la 4°C, în vederea utilizării în tehnica ELISA de dozare a trenbolonei.

Procedeul conform invenției constă în cuplajul covalent al antigenului conjugatului imunogen-ovalbumina-trenbolona la nanoparticule de bioxid de siliciu, având avantajul unei suprafețe specifice mari ( $> 200 \text{ m}^2/\text{g}$ ) comparativ cu metoda clasică ( $\text{cm}^2/\text{g}$ ), cuplarea covalentă elimină desorbția antigenului din metoda clasică, scăderea timpului de analiză în tehnica ELISA în faza omogenă, față de tehnica clasică în care reacția antigen anticorp este heterogenă (are loc la suprafața tubului de reacție), reducerea timpului de incubare necesar atingerii echilibrului chimic, datorită numărului mare de nanoparticule în suspensie (faza omogenă) cu substanța de analizat, a distanțelor de difuzie mici și a cineticii rapide a reacției imune, stabilitatea mare a nanoimunosorbentului este dată de legarea covalentă a antigenului pe suprafața nanoparticulelor cu suprafața specifică mare (de exemplu 1 g de nanoimunosorbent este utilizat în  $10^5$  analize).

Procedeul conform invenției constă în aceea că 2 g de nanoparticule de bioxid de siliciu de marime  $\Phi = 14 \text{ nm}$  ( $14 \cdot 10^{-9} \text{ m}$ ) și arie  $200 \text{ m}^2/\text{g}$  sunt tratate cu  $\text{HNO}_3$  10% timp de 1 h la temperatura de 60°C, urmat de incubare cu soluție de  $\alpha$ -aminopropiltriethoxisilan 10% în apă distilată, pentru 3 h, la 70°C. Se spală cu apă distilată de 3 ori, apoi cu alcool etilic și se depozitează la 4°C, în vederea cuplării cu antigenul proteină-steroid. Procedeul conform invenției constă în aceea că legarea covalentă a antigenului proteină-steroid de nanoparticulă folosește glutaraldehida ca agent de cuplaj.

Procedeul constă în 6 etape, E1, E2, E3, E4, E5 și E6.

E1: Obținerea nanoparticulelor  $\text{SiO}_2$  grefate cu  $\alpha$ -aminopropiltriethoxisilan: 2 g de nanoparticule de  $\text{SiO}_2$  ( $\Phi = 14 \text{ nm}$  și arie specifică  $200 \text{ m}^2/\text{g}$ ) și 100 ml  $\text{HNO}_3$  10% sunt agitate, timp de 1 h, la temperatura de 60°C. După îndepărtarea supernatantului prin centrifugare la 1500xg, timp de 10 min, nanoparticulele sunt colectate și tratate cu 100 ml de  $\alpha$ -aminopropiltriethoxisilan 10% în apă distilată, sub continuă agitare, la temperatura de 70°C, timp de 3 h. Amestecul este centrifugat la 1500xg, timp de 10 min, supernatantul fiind înlăturat, iar nanoparticulele de  $\text{SiO}_2$ - $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{Si}-\text{C}_3\text{H}_6-\text{NH}_2$  sunt colectate și spălate de 3 ori cu apă distilată (30 ml), urmată de o spălare cu un volum de 20 ml de alcool etilic.

E2: Activarea nanoparticulei funcționalizate cu glutaraldehidă: la 1,5 g nanoparticule rezultate din etapa E1, se adaugă un volum de 50 ml soluție de glutaraldehidă 0,1% în apă distilată, sub continuă agitare, la temperatura de 35°C, timp de 15 min, urmată de centrifugare la 1500xg, timp de 15 min, și îndepărtarea supernatantului. Nanoparticulele activate cu glutaraldehidă sunt folosite imediat pentru cuplarea cu antigenul trenbolon-ovalbumină.

E3: Obținerea Trenbolon-3-carboximetil oximă: 0,5 g trenbolona ( $M_w = 270,37 \text{ Da}$ ) și 0,5 g de acid oxiaminoacetic ( $M_w = 108 \text{ Da}$ ) au fost dizolvate în 50 ml alcool etilic. Soluția obținută a fost adusă la pH alcalin prin adăugare de 5 ml NaOH 10% și a fost refluxată timp de 5 h. Soluția a fost concentrată prin evaporare sub vid. Concentratul obținut a fost diluat cu apă și extras cu eter etilic, în vederea îndepărtării steroidului rămas nereacționat. Soluția apoasă alcalină a fost acidulată cu acid clorhidric, HCl concentrat. Precipitatul obținut a fost colectat și uscat în vid, timp de 2 h, cu ajutorul pompei de vid și a exicatorului.

# RO 128870 B1

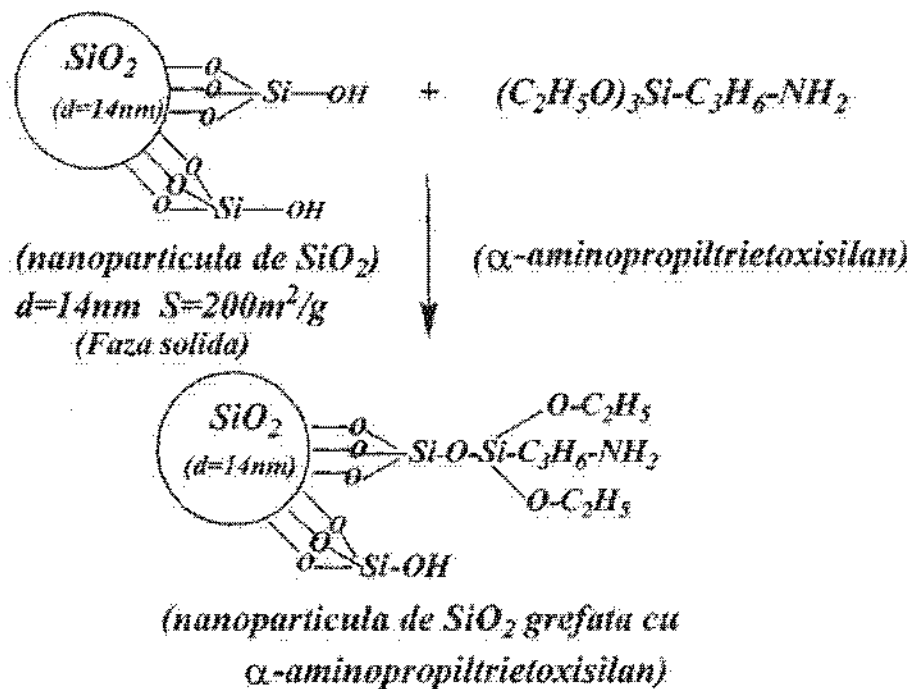
1 E4: Activarea trenbolon-COOH cu carbodiimidă și N-hidroxisuccinimidă: 100 mg  
trenbolona-COOH, 50 mg N-hidroxisuccinimidă și 200 mg de carbodiimidă în 3,5 ml dimetil-  
3 formamidă sunt puse în reacție timp de 4 h, sub agitare magnetică, la temperatura camerei, în  
vederea activării grupării carboxi a trenbolonei.

5 E5: Obținerea conjugatului imunogen trenbolon-ovalbumină: 2 ml din amestecul activat  
de steroid se adaugă picătură cu picătură la 8 ml soluție de ovalbumină 20 mg/ml în tampon  
7 carbonat de sodiu 50 mM, pH 9,6. Reacția de cuplare la proteină se efectuează timp de 24 h,  
sub continuă agitare, la temperatura camerei. Produsul obținut trenbolon-ovalbumină se purifică  
9 pe cromatografie pe coloana de Sephadex G25, având ca solvent de eluție tamponul fosfat  
50 mM, pH 7,24.

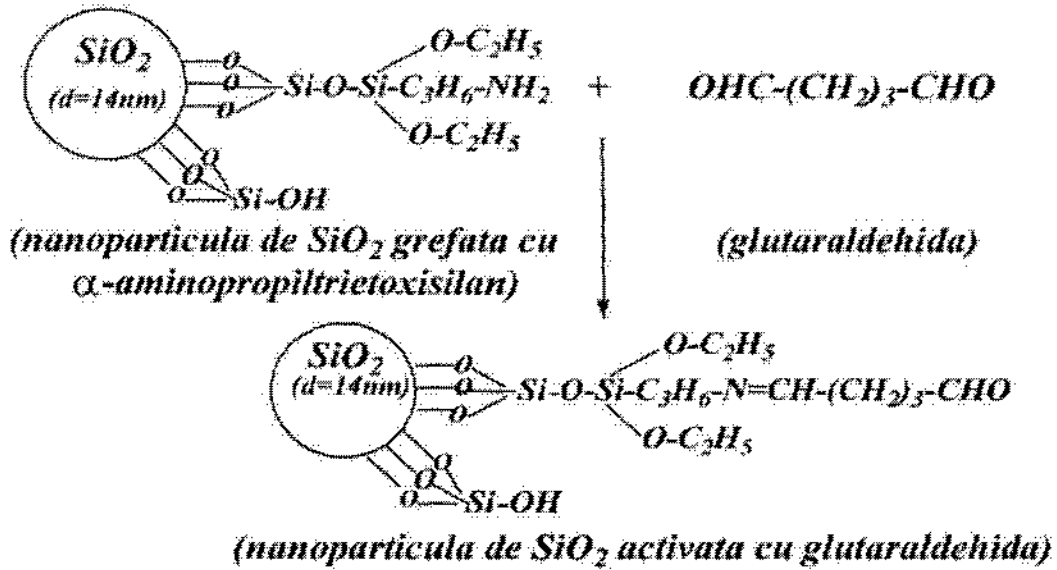
11 E6: Cuplarea conjugatului imunogen la nanoparticula activată cu glutaraldehidă și  
obținerea nanoimunisorbentului: Nanoparticulele activate rezultate din etapa E2 se suspendă  
13 în 50 ml tampon fosfat 50 mM, pH 8,6, apoi se adaugă 1 ml soluție conjugat imunogen  
trenbolon-ovalbumină 2 mg/ml la temperatura de 35°C, sub agitare continuă, timp de 2 h,  
15 umată de centrifugare la 1500xg, timp de 15 min, și îndepărtarea supernatantului, apoi spălate  
de 3 ori cu tampon fosfat 50 mM, pH 8,6, nanoparticulele de imunisorbent  $\text{SiO}_2-(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{Si}-\text{C}_3\text{H}_6-$   
17  $\text{N}=\text{HC}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}=\text{N}$ -trenbolon-ovalbumină, obținute în urma centrifugării, se depozitează la  
4°C, în vederea utilizării în tehnica ELISA de dozare a trenbolonei.

19 Reacțiile chimice de obținere a nanoimunisorbentului nanoparticulă de  $(\text{SiO}_2)-$   
 $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{Si}-\text{C}_3\text{H}_6-\text{N}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}=\text{N}$ -ovalbumină-trenbolonă sunt prezentate în continuare:

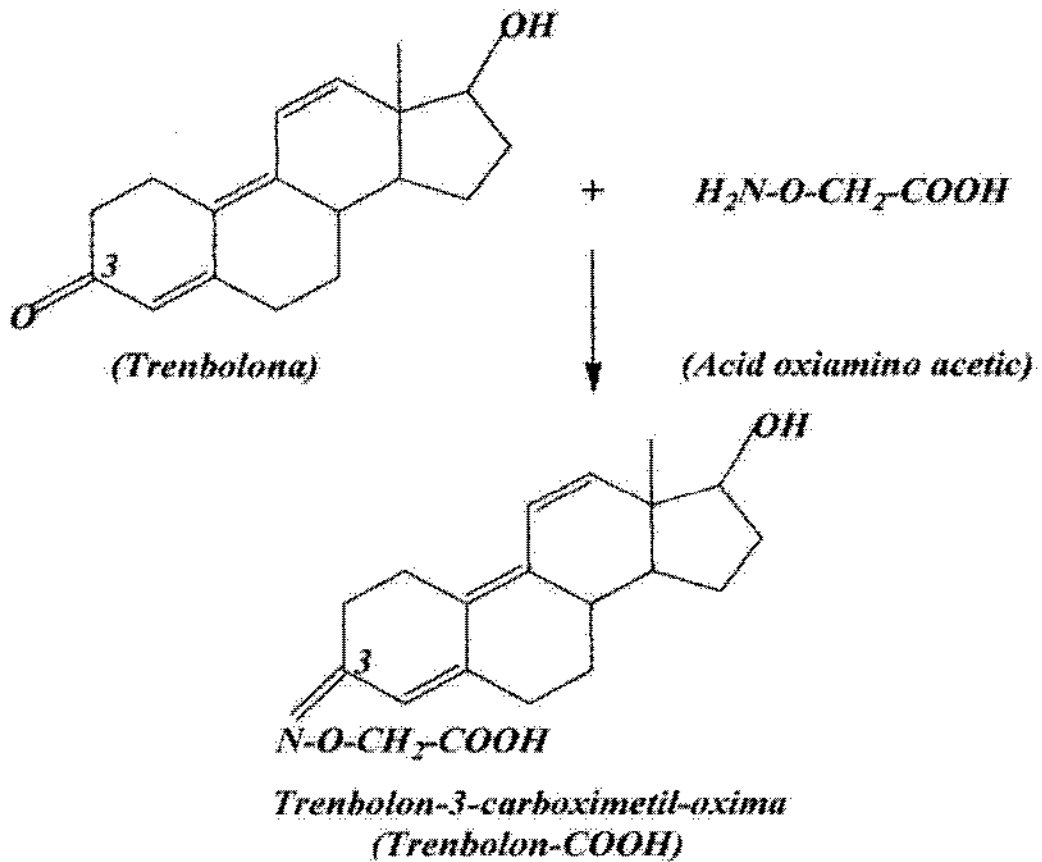
## 23 *Etapa 1: Obținerea nanoparticulelor de $\text{SiO}_2$ grefate cu $\alpha$ -* 25 *aminopropiltriethoxisilan*



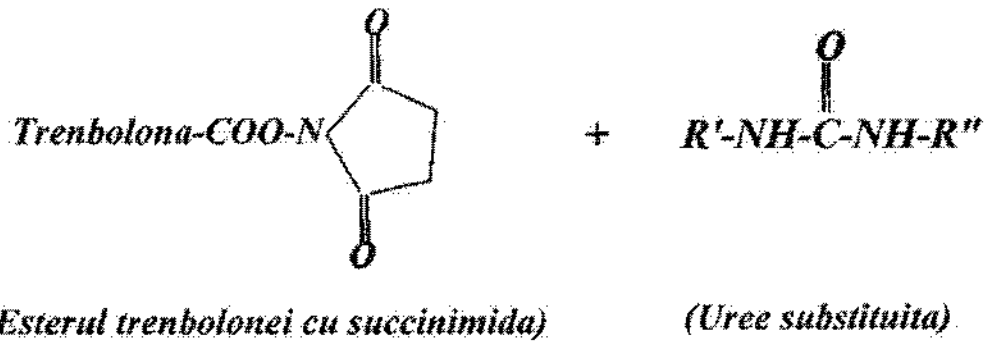
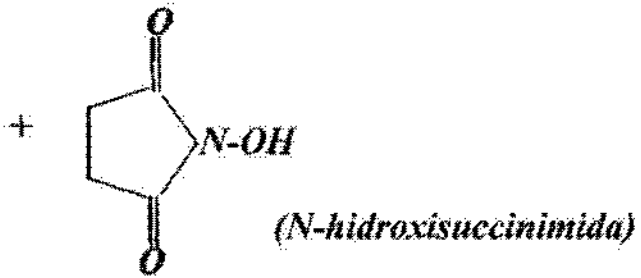
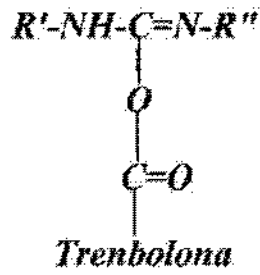
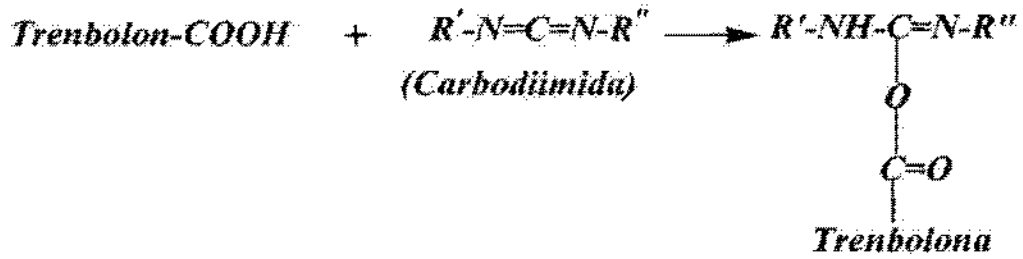
Etapa 2: Activarea nanoparticulei functionalizate cu glutaraldehida



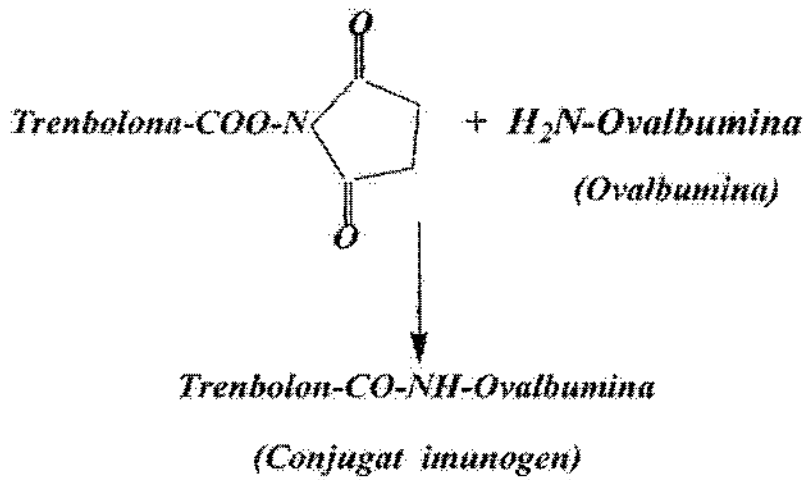
Etapa 3. Obținerea Trenbolon-3-carboximetil oxima



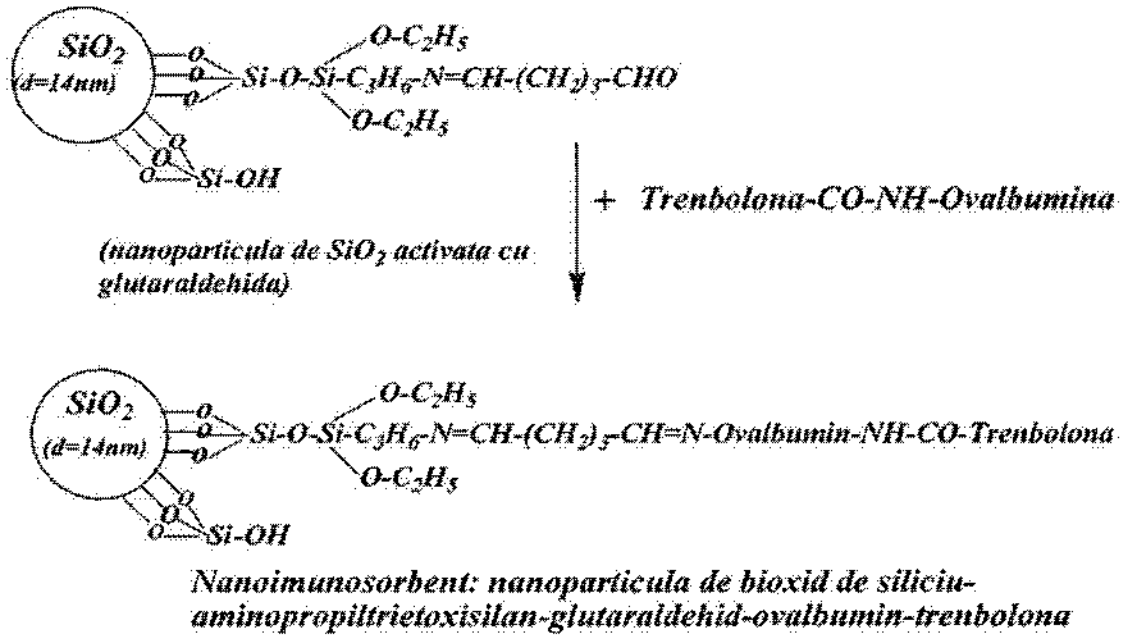
Etapa 4. Activarea trenbolon-COOH cu carbodiimida si N-hidroxisuccinimida



Etapa 5, Obținerea conjugatului imunogen trenbolon-ovalbumina



Etapa 6: Cuplearea conjugatului imunogen la nanoparticula activata cu glutaraldehida si obtinerea nanoimunisorbentului



# RO 128870 B1

1           Procedeul conform invenției prezintă avantajul că, prin utilizarea nanoparticulelor de  
oxid de siliciu de mărime 14 nm și suprafață specifică de 200 m<sup>2</sup>/g, rezultă nanoimunisorbenți  
3 ce pot fi utilizați în tehnica ELISA în faza omogenă, reacția antigen anticorp fiind mai rapidă  
decât în tehnica ELISA clasică (fază heterogenă), ceea ce conduce la reducerea timpului de  
5 analiză, iar separarea complexului imun se face simplu, prin centrifugarea nanoimunisorben-  
tului cuplat cu antigenul, iar cantitatea de nanoimunisorbent utilizat la o imunoanaliză este  
7 extrem de mică, datorită suprafeței specifice mari.

8           Se prezintă mai jos un exemplu de aplicare a procedurii conform invenției pentru  
9 obținerea nanoimunisorbentului nanoparticulă de bioxid de siliciu-aminopropil-trietoxisilan-  
glutaraldehydă-ovalbumină-trenbolonă, ce conține obiectul acestei invenții.

11           Potrivit invenției, 2 g de nanoparticule de SiO<sub>2</sub> de mărime  $\Phi = 14$  nm și arie 200 m<sup>2</sup>/g  
se tratează cu o soluție de HNO<sub>3</sub> 10%, timp de 1 h, urmată de incubare cu  $\alpha$  aminopropil-  
13 trietoxisilan 10% în apă distilată, pentru 3 h, la 70°C, urmată de spălarea cu 30 ml apă distilată  
de 3 ori și 20 ml alcool etilic o dată, iar supernatantul este îndepărtat prin centrifugare la  
15 1500xg, timp de 10 min, urmată de tratarea nanoparticulelor, în vederea activării, cu 50 ml solu-  
ție de glutaraldehydă 0,1% în apă distilată, sub agitare continuă, la temperatura de 35°C, super-  
17 natantul este îndepărtat prin centrifugare la 1500xg, timp de 15 min, iar nanoparticulele activate  
rezultate se suspendă în tampon fosfat 50 mM, pH 8,6, urmată de adăugarea de 1 ml conjugat  
19 imunogen ovalbumină-trenbolona, obținut prin reacția E3 de activare a trenbolonei, amestec  
de reacție dintre 100 mg trenbolona, 50 mg N-hidroxisuccinimidă și 200 mg carbodiimidă în  
21 3,5 ml dimetilformamidă, reacție desfășurată timp de 4 h, sub agitare, urmată de cuplarea oval-  
buminei de steroidul activat, reacția E5 realizată prin adaosul de 2 ml din amestecul activat de  
23 steroid la 8 ml soluție de ovalbumină 20 mg/ml în tampon carbonat de sodiu 50 mM, pH 9,6,  
reacție ce se desfășoară timp de 24 h, iar conjugatul imunogen rezultat, trenbolon-ovalbumină,  
25 este purificat prin cromatografie pe coloană de Sephadex G25, având ca solvent de eluție  
tampon fosfat 50 mM, pH 7,24, iar conjugatul imunogen purificat de concentrație 2 mg/ml în  
27 apă distilată se adaugă la nanoparticulele activate cu glutaraldehydă, amestecul de reacție  
rezultat se agită, timp de 2 h, apoi se centrifughează la 1500xg, timp de 15 min, supernatantul  
29 se îndepărtează, iar precipitatul nanoparticule de imunisorbent rezultat se spală de 3 ori cu  
tampon fosfat 50 mM, pH 8,6, centrifugate la 1500xg, cu îndepărtarea supernatantului,  
31 imunisorbentul nanoparticule de bioxid de siliciu-aminopropil-trietoxisilan-glutaraldehyd-  
ovalbumină-trenbolona se depozitează la 4°C, în vederea utilizării în tehnica ELISA de dozare  
33 a trenbolonei.



Procedeu de obținere a nanoimunisorbentului nanoparticulă de bioxid de siliciu-aminopropil-trietoxisilan-glutaraldehyd-ovalbumină-trenbolonă, caracterizat prin aceea că acesta cuprinde următoarele etape:

3

5

a) tratarea a 2 g de nanoparticule de  $\text{SiO}_2$  de mărime  $\Phi = 14 \text{ nm}$  și arie  $200 \text{ m}^2/\text{g}$  cu o soluție de  $\text{HNO}_3$  10%, timp de 1 h, urmată de incubarea cu  $\alpha$  aminopropiltriethoxisilan 10% în apă distilată, pentru 3 h, la  $70^\circ\text{C}$ , urmată de spălarea cu 30 ml apă distilată de 3 ori și 20 ml alcool etilic o dată, cu îndepărtarea supernatantului prin centrifugare la  $1500 \times g$ , timp de 10 min, urmată de tratarea nanoparticulelor, în vederea activării, cu 50 ml soluție de glutaraldehyd 0,1% în apă distilată, sub agitare continuă, la temperatura de  $35^\circ\text{C}$ , supernatantul fiind îndepărtat prin centrifugare la  $1500 \times g$ , timp de 15 min,

7

9

11

b) obținerea trenbolon-3-carboximetil oximei prin dizolvarea de trenbolonă și acid oxiaminoacetic, în raport în greutate de 1:1, în alcool etilic, aducerea soluției rezultate la pH alcalin prin adăugare de NaOH 10% și refluxarea acesteia timp de 5 h, urmată de concentrare prin evaporare sub vid, diluare cu apă, extracție cu eter etilic, acidularea soluției apoase alcaline cu HCl concentrat, urmată de colectarea și uscarea precipitatului,

13

15

17

c) punerea în reacție a 100 mg trenbolon-3-carboximetil oximă cu 50 mg N-hidroxi-succinimidă și 200 mg carbodiimidă în 3,5 ml dimetilformamidă, timp de 4 h, sub agitare, urmată de cuplarea ovalbuminei de trenbolonă activată, prin adaosul de 2 ml din amestecul activat de trenbolonă la 8 ml soluție de ovalbumină 20 mg/ml în tampon carbonat de sodiu 50 mM, pH 9,6, reacție ce se desfășoară timp de 24 h, conjugatul imunogen rezultat, trenbolon-ovalbumină, fiind apoi purificat prin cromatografie pe coloană de Sephadex G25, având ca solvent de eluție tampon fosfat 50 mM, pH 7,24,

19

21

23

d) adăugarea conjugatului imunogen trenbolon-ovalbumină purificat de concentrație 2 mg/ml în apă distilată la nanoparticulele activate cu glutaraldehyd și suspendate în tampon fosfat 50 mM, pH 8,6, sub agitare, timp de 2 h, urmată de centrifugare la  $1500 \times g$ , timp de 15 min, cu îndepărtarea supernatantului, iar apoi precipitatul nanoparticule de imunisorbent rezultat se spală de 3 ori cu tampon fosfat 50 mM, pH 8,6, iar particulele de imunisorbent bioxid de siliciu-aminopropiltriethoxisilan-glutaraldehyd-ovalbumină-trenbolonă, obținute în urma centrifugării, se depozitează la  $4^\circ\text{C}$ , în vederea utilizării în tehnica ELISA de dozare a trenbolonei.

25

27

29

31

