



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2013 00936

(22) Data de depozit: 28.11.2013

(41) Data publicării cererii:
30.06.2015 BOPI nr. 6/2015

(71) Solicitant:
• 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

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

(57) Rezumat:

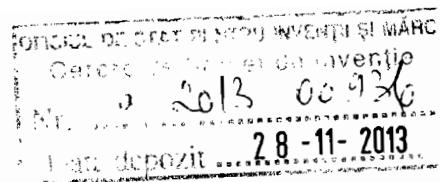
Invenția se referă la un procedeu de obținere a produsului acid 2,4-diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotina, utilizat ca marker în tehnica imunochimică de dozare a pesticidului acid 2,4-diclorofenoxi în probe biologice și de mediu. Procedeu conform invenției constă în dizolvarea a 5 mg biotin- NHS în 1 ml dimetil sulfoxid, soluția rezultată se adaugă sub agitare la o soluție de 1,3-diaminopropan dizolvat în tampon carbonat de sodiu, și amestecul este lăsat la temperatura camerei să reacționeze timp de 3 h, cu formarea derivatului biotin-amidopropilen amina, care, după purificare, se

amestecă în volum de 2 ml cu 0,5 ml amestec pesticid activat cu 10 mg N-hidroxisuccinimidă și 30 mg 1-etil-3(3-diaminopropilcarbodiimidă), amestecul de reacție este lăsat să reacționeze la temperatura camerei timp de 3 h, din care rezultă produsul acid 2,4- diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotina care, după purificare, se depozitează în alcool etilic la temperatura de -20°C, în vederea utilizării.

Revendicări: 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

Procedeu de obtinere a produsului acid 2,4-diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotina

Inventia se refera la procedeul de obtinere a markerului utilizat in tehnica imunochimica in faza omogena pentru dozarea pesticidului acid 2,4-diclorofenoxiacetic in probe biologice si de mediu.

In prezent sunt cunoscuti markeri enzimatici realizati prin cuplarea directa a pesticidului activat cu carbodiimida utilizand enzime ca fosfataza alcalina sau indirect ca peroxidaza printr-o legare covalenta la o diamina ce formeaza o legatura intre pesticid si proteina (enzima). Markerii enzimatici obtinuti si utilizati in tehnicile imunochimice de dozare cu mase moleculare mari si in consecinta prezinta o cinetica de reactie lenta in reactie cu anticorpii antipesticid. Avantajul produsului acid 2,4-diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotina avand masa moleculara mica in reactia imuna dintre pesticidul ce urmeaza a fi determinat si anticorpii omolog (anticorpii anti 2,4-D) prezinta o cinetica rapida, un timp scurt pentru atingerea echilibrului chimic dintre componente fata de markerii enzimatici sus mentionati si in consecinta, un timp scurt de analiza a probei. Procedeul conform inventiei consta in aceea ca 5 mg de biotin-NHS dizolvata in 1 ml dimetilsulfoxid (DMSO) si introdusa picatura cu picatura sub agitare continua peste 4 ml solutie de 1,3-diaminopropan 150 mg dizolvate in tampon carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6. Amestecul sub agitare este lasat sa reactioneze timp de 3 ore, iar produsul biotin-propilenamina se separa prin cromatografie pe coloana de Sephadex G-10 (H=30 cm, $\Phi=1$ cm) avand ca eluent solutia de tampon carbonat 50 mM pH 9,6. Produsul biotin-propilenamina este utilizat la cuplare cu pesticidul acid 2,4-diclorofenoxiacetic activat cu carbodiimida si N-hidroxisuccinimida. Pentru activarea pesticidului se dizolva intr-un volum de 1 ml de dimetil formamida (DMF) 10 mg acid 2,4-diclorofenoxiacetic, 10 mg N-hidroxisuccinimida si 30 mg 1-etil-3-(3'-diaminopropil)-carbodiimida si se agita 3 ore in vederea activarii gruparii carboxi a pesticidului. In final 0,5 ml de solutie de pesticid activat in DMF se adauga picatura cu picatura sub agitare la 2 ml solutie de biotin-propilenamina. Amestecul se lasa timp de 3 ore sub agitare la temperatura camerei, iar produsul obtinut acid 2,4-diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotina se separa prin cromatografie pe coloana de Sephadex G10, iar fractiunea ce contine produsul este purificata pe cromatografie in strat subtire de silicagel G avand ca eluent amestecul benzen:acetona 3:1 (V/V). Pudra de silicagel G ce contine produsul se extrage cu alcool etilic iar silicagelul este inlaturat prin centrifugare la 1500 xg timp de 10 min. Produsul acid 2,4-diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotina in alcool etilic se depoziteaza la -20°C in vederea utilizarii acestuia in tehnica imunochimica de dozare a pesticidului acid 2,4-diclorofenoxiacetic. Procedeul de obtinere a markerului cu biotina consta in 6 etape, E1÷E6.

E1) Activarea pesticidului acidului 2,4-diclorofenoxiacetic cu 1-etil-3-(3'-diaminopropil)-carbodiimida

O solutie de 10 mg acid 2,4-diclorofenoxiacetic (2,4-D), 10 mg N-hidroxisuccinimida (NHS) si 30 mg 1-etil-3-(3'-diaminopropil)-carbodiimida in 1 ml dimetilformamida si se agita 3 ore in vederea activarii gruparii carboxi a pesticidului.

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

5 mg biotin-NHS se dizolva in 1 ml dimetilsulfoxid (DMSO) iar solutie obtinuta se introduce picatura cu picatura sub agitare peste 4 ml solutie de 150 mg 1,3-diaminopropan dizolvat in tampon carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6 iar reactia de cuplare se desfasoara pe o durata de 3 ore la temperatura camerei.

E3) Purificarea derivatului biotin-amidopropilen amina Amestecul de reactie obtinut in etapa 2 este cromatografiat pe coloana de Sephadex G-10 (H=30 cm, $\Phi=1$ cm) avand ca eluent tampon carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6.



E4) Reactie de cuplare a pesticidului activat (E1) la biotin-amidopropilen amina

0,5 ml solutie de pesticid activat obtinut in etapa 1 este introdusa picatura cu picatura sub agitare peste 2 ml solutie de biotin-propilen-amina obtinut in etapa 3. Reactia de cuplare a pesticidului la biotin-propilen-amina se desfasoara pe o perioada de 3 ore la temperatura camerei.

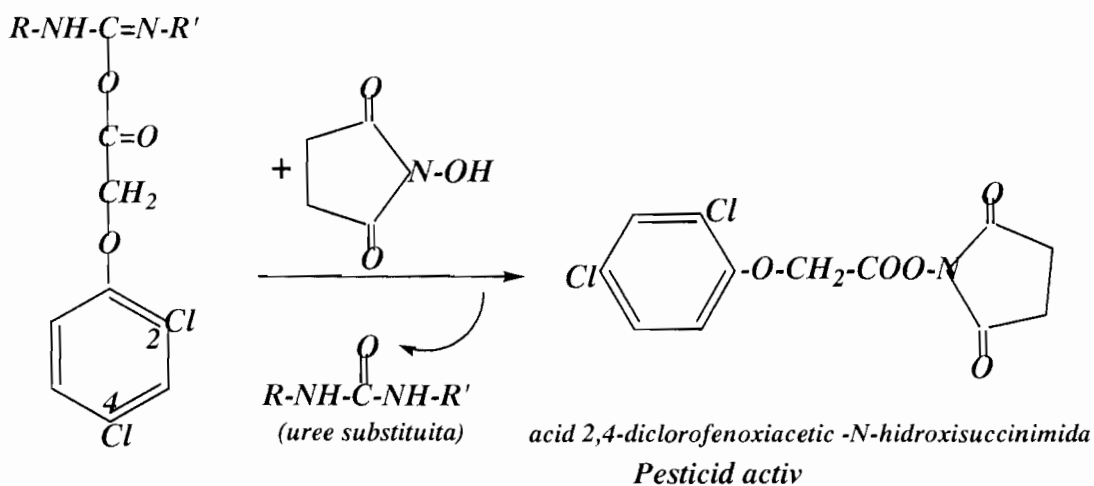
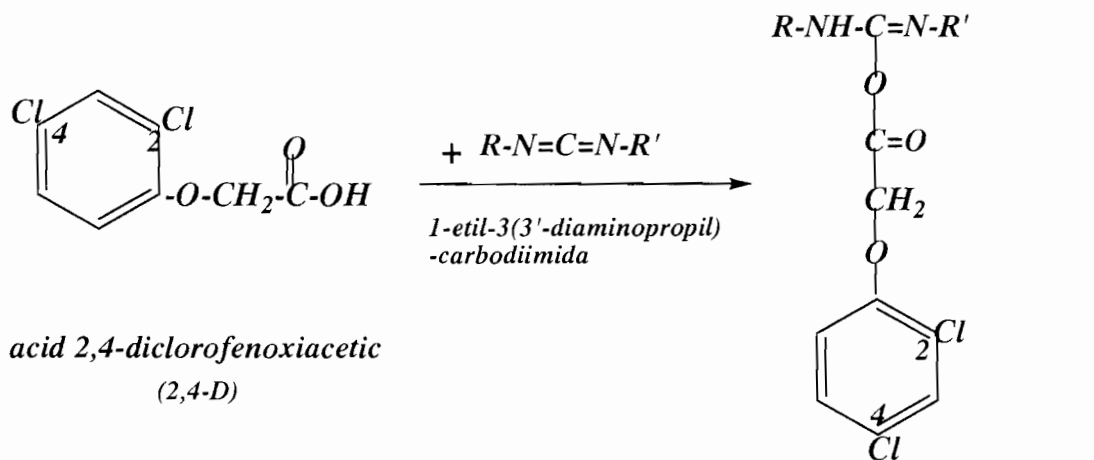
E5) Separare produsului acid 2,4-diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotina pe Sephadex G-10

Amestecul de reactie rezultat in etapa 4 este cromatografiat pe coloana de Sephadex G-10 iar eluentul este tampon fosfat de sodiu 10 mM pH 7,2.

E6) Purificarea compusului acid 2,4-diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotina

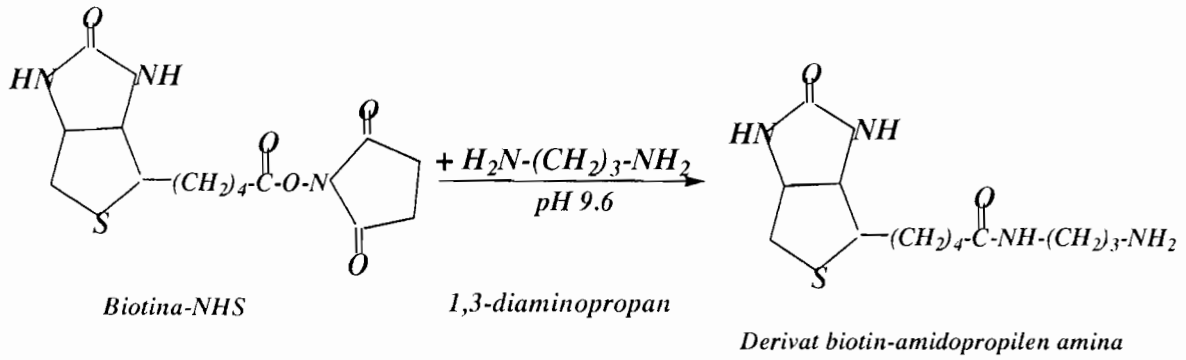
Fractiunea ce contine produsul acid 2,4-diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotina rezultat in etapa 5 este cromatografiat pe cromatografie in strat subtire de silicagel G avand ca eluent amestecul benzen:acetona 3:1 (V/V). Dupa uscarea placii pudra din zona ce contine produsul este extras cu alcool etilic iar silicagelul indepartat prin centrifugare la 1500 x g timp de 10 minute. Produsul purificat se depoziteaza in alcool etilic la temperatura de -20 °C in vederea utilizarii.

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

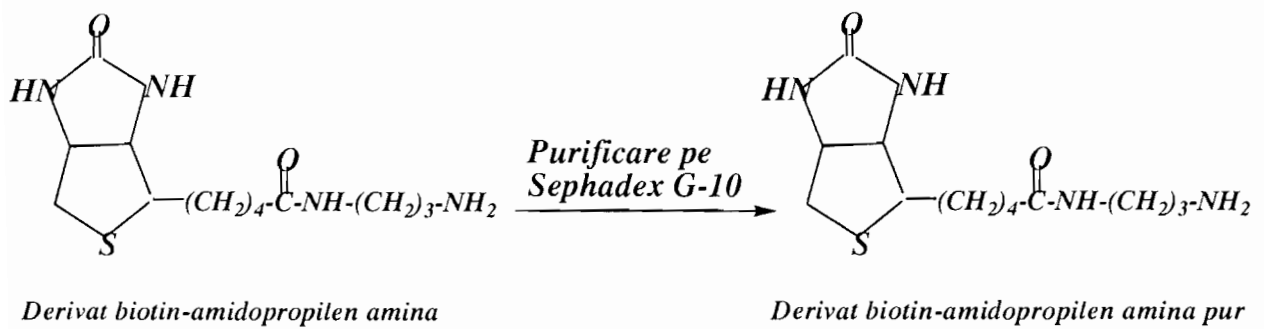


N. Zamfir

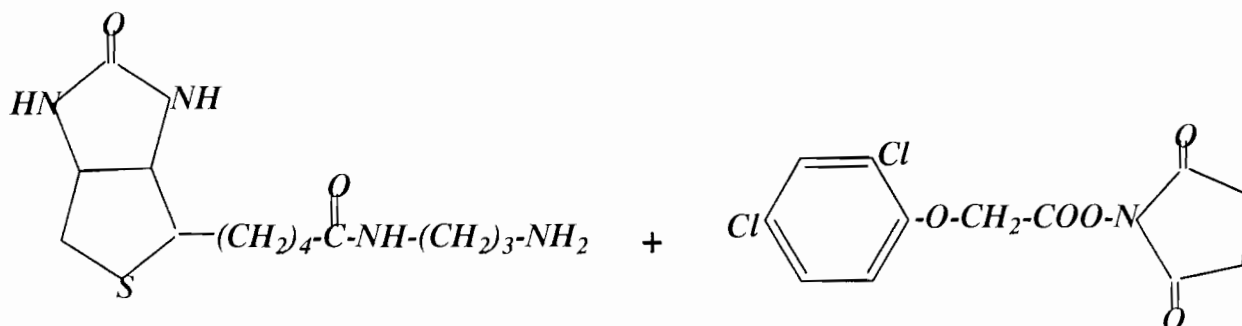
E2: Cuplarea biotinei-NHS cu 1,3-diaminopropan



E3: Purificarea derivatului biotin-amidopropilen amina

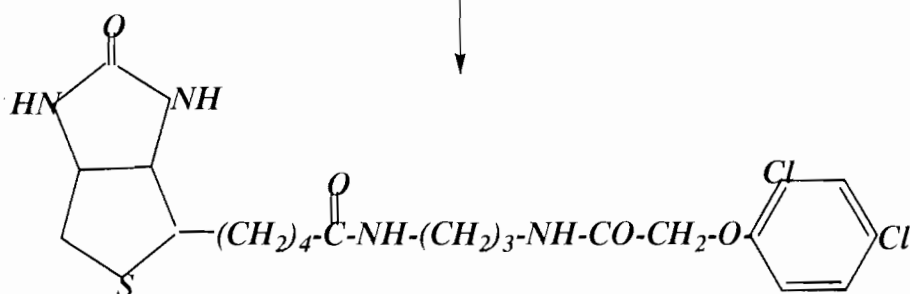


Etapa 4: Reactia de cuplare a pesticidului activat (E1) la biotin-amidopropilen amina



Derivat biotin-amidopropilen amina
(Solutie in carbonat de sodiu 50 mM
pH9,6)

Acid 2,4-diclorofenoxiacetic-NHS
(solutie in dimetil formamida)



acid 2,4-diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotina

Etapa 5: Separarea produsului acid 2,4-diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotina pe Sephadex G10

acid 2,4 diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotina

Separare produs pe
Sephadex G-10

acid 2,4 diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotina



Etapa 6: Purificarea compusului acid 2,4-diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotina

acid 2,4-diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotina



*Purificare pe
Silicagel G,
extractie in alcool etilic*

acid 2,4-diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotina



REVENDICARI

Procedeul de obtinere a markerului biotinic acid 2,4-diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotina caracterizat prin dizolvarea a 5 mg biotin-NHS in 1 ml dimetil sulfoxid iar solutia rezultata se adauga picatura cu picatura sub agitare la 4 ml solutie de 150 mg 1,3-diaminopropan dizolvat in tampon carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6, lasat sa reactioneze 3 ore la temperatura camerei pentru cuplarea diaminei la biotina cu formarea derivatului biotin-amidopropilen amina ce este purificat pe coloana de Sephadex G-10 avand ca eluent tamponul carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6 iar 2 ml de fractiune ce contine produsul este amestecat cu 0,5 ml amestec de pesticid activat prin dizolvarea a 10 mg acid 2,4-diclorofenoxiacetic, 10 mg N-hidroxisuccinimida si 30 mg 1-etil-3-(3'-diaminopropil)-carbodiimida in 1 ml dimetilformamida pe durata de 3 ore la temperatura camerei iar amestecul dintre 0,5 ml solutia de pesticid activat si 2 ml fractiunea ce contine derivatul biotin-amidopropilen amina este lasat sub agitare sa reactioneze la temperatura camerei timp de 3 ore iar produsul acid 2,4 diclorofenoxi-amidopropilen-amido biotina este separat pe coloana de Sephadex G-10 avand ca solvent de elutie tampon fosfat 10 mM pH 7,2 si in final purificat prin cromatografie in strat subtire pe silicagel G extras cu alcool etilic si obtinut prin centrifugare la 1500 x g timp de 10 minute si depozitat la -20 °C in vederea utilizarii acestuia in tehnica imunochimica de dozare a pesticidului acid 2,4-diclorofenoxiacetic.



Nicolae Victor Zamfir