



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2015 00885**

(22) Data de depozit: **25/11/2015**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/08/2021** BOPI nr. **8/2021**

(41) Data publicării cererii:  
**30/06/2017** BOPI nr. **6/2017**

(73) Titular:  
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE  
ȘI DEZVOLTARE PENTRU FIZICĂ ȘI  
INGINERIE NUCLEARĂ "HORIA  
HULUBEI", STR.REACTORULUI NR.30,  
C.P. MG-6, MĂGURELE, IF, RO**

• **DOROBANȚU IOAN,**  
**ALEEA CÂMPUL CU FLORI NR.1, BL.OD 2,**  
**SC.C, AP.110, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,**  
**RO;**  
• **NEAGU LIVIA, ALEEA POIANA VADULUII**  
**NR.1, BL.OD8, SC.1, AP.10, SECTOR 6,**  
**BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**RO 125536 B1; RO 122695 B1**

(72) Inventatori:

(54) **PROCEDEU DE OBȚINERE A MARKERULUI ACID  
2,4-DICLOROFENOXI-ALBUMINĂ SERICĂ DE  
CAPRINĂ-BIOTINĂ PENTRU DOZAREA PESTICIDULUI ACID  
2,4-DICLOROFENOXIACETIC (2,4-D) ÎN PROBE BIOLOGICE  
ȘI DE MEDIU**



# RO 132003 B1

1           Invenția se referă la procedeul de obținere a markerului utilizat în tehnica imuno-  
chimică în fază omogenă pentru dozarea acidului 2,4-diclorofenoxiacetic (2,4-D) în probe  
3 biologice și de mediu.

          În prezent sunt cunoscuți markeri enzimatici realizați prin cuplarea pesticidului activat  
5 cu carbodiimidă cu enzima fosfataza alcalină sau peroxidază. Acești markeri pot fi utilizați  
în tehnica ELISA (tehnica imunochimică de dozare în faza omogenă bazată pe  
7 imunosorbenți-componente imune antigen sau anticorp cuplate covalent la suprafața fazei  
solide și markeri enzimatici tip antigen sau anticorp-enzimă) clasica de dozare pesticidică,  
9 dar care prezintă dezavantaje privind legarea nespecifică a acestuia la suprafața fazei solide  
utilizate în tehnica în raport cu legarea specifică la anticorpul cuplat la suprafață. Brevetul  
11 **RO 125536 B1** prezintă un procedeul de obținere a markerului enzimatic acid 3,6-dicloro-2-  
metoxibenzoil-hexametilendiamin-glutardehid-fosfatază alcalină, în care se dizolvă acid 3,6-  
13 dicloro-2-metoxi benzoic, N-hidroxisuccinimidă și carbodiimidă în dimetilformamidă și se  
agită amestecul care a fost activat cu o soluție de hexametildiamină în tampon carbonat  
15 de sodiu și este lăsat să reacționeze apoi se supune cromatografiei pe Silicagel tip G, se ia  
o soluție astfel purificată, în tampon fosfat, fosfatază alcalină sunt amestecate cu o soluție  
17 de glutaraldehidă și sunt lăsate să reacționeze, reacția este apoi oprită prin adăugarea unei  
soluții de glicină în tampon fosfat pH 8, urmat de cromatografia amestecului de reacție pe  
19 Sephadex G25 obținându-se markerul enzimatic purificat care este depozitat la -18°C.  
**RO 122695 B1** descrie un procedeul de obținere a markerului enzimatic nandrolon-3-  
21 carboximetiloxim-albumină serică bovină-fosfatază alcalină (Nand-3CMO-ASB-FA) din  
nandrolonă cu acid oxiaminoacetic în soluție de alcool etilic și NaOH apoi se concentrează  
23 prin evaporare și se extrage cu eter etilic, se precipită cu o soluție de HCl iar precipitatul  
nand-3-CMO este activat cu carbodiimidă în dioxan:apăși se supune reacției cu ASB urmat  
25 de purificare prin dializă și liofilizare iar nand-3-CMO-ASB și fosfataza alcalină sunt puse în  
reacție cu ajutorul glutaraldehidei ca agent de cuplare a markerului obținut, nandrolon-3-  
27 CMO-ASB-FA este separat pe Sephadex G50 și este depozitat la 4°C.

          Problema pe care o rezolvă invenția constă în prezentarea unui procedeul de  
29 obținere al markerului 2,4-diclorofenoxi-albumina serică de caprină-biotină.

          Procedeul de obținere al markerului 2,4-diclorofenoxi-albumina serică de caprină-  
31 biotină conform invenției înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că se dizolvă 5 mg  
biotină, 5 mg N-hidroxisuccinimidă și 20 mg 1-etil-3-(3-dimetilaminopropilcarbodiimidă) în 1  
33 ml dimetil sulfoxid și este lăsat să reacționeze timp de 1 h iar amestecul rezultat se adaugă  
la 3 ml soluție de albumină serică de caprină de concentrație 10 mg/ml sub agitare continuă  
35 în tampon carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6 și este lăsat să reacționeze timp de 3 h la  
temperatura camerei și 24 h la 4°C rezultând albumina serică de caprină-biotină care se  
37 purifică pe coloana de sephadex G25 care are ca eluent carbonatul de sodiu 50 mM pH 9,6  
iar albumina serică de caprină-biotină purificată a fost pusă să reacționeze cu un amestec  
39 pesticid activat obținut din 10 mg acid 2,4-diclorofenoxiacetic, 10 mg N-hidroxisuccinimidă  
și 30 mg letil-3-(3-dimetilaminopropilcarbodiimidă) în 1 ml dimetilformamidă timp de 2 h și  
41 în final reacția de cuplare a pesticidului activat la conjugalul albumina serică de caprină-bio-  
tină care se desfășoară timp de 3 h la temperatura camerei și 24 h la 4°C, iar produsul acid  
43 2,4-diclorofenoxi-albumina serică de caprină-biotină se purifică pe coloana de Sephadex G25  
având ca eluent tamponul fosfat 10 mM pH 7,4 și se depozitează la -10°C în vederea utilizării  
45 în tehnica imunochimică de dozare în faza omogenă a pesticidului acid 2,4-diclorofenoxi-  
acetic din probe alimentare și de mediu.

# RO 132003 B1

Prin aplicarea invenției se obține avantajul că produsul acid 2,4-diclorofenoxi-  
albumina serică de caprină-biotină reduce nespecificitatea sistemului de analiză, amplifică  
semnalul enzimatic specific datorat multiplelor grupări de biotină cuplate la albumină în reac-  
ția biotinei cu streptavidin-peroxidaza, markerul enzimatic utilizat în tehnica imunochimică  
de dozare și în consecință creșterea sensibilității sistemului de analiză.

Procedeeul conform invenției constă în aceea ca 5 mg de biotină, 5 mg N-hidroxi-  
succinimida (NHS) și 20 mg 1-etil-3-(3-dimetilaminopropilcarbodiimida) (CDI) sunt dizolvate  
în 1 ml dimetilsulfoxid și lăsate să reacționeze timp de 1 h la temperatura camerei în vederea  
activării grupării carboxi a biotinei. Amestecul activat se adaugă picătură cu picătură la 3 ml  
soluție albumină serică de caprină (10 mg/ml) în tampon carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6  
și lăsat să reacționeze 3 h la temperatura camerei și timp de 24 h la 4°C. Produsul rezultat  
conjugat albumina serică de caprină-biotină (ASC-biotina) se purifică pe coloana de  
Sephadex G25 având ca eluent tamponul carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6. Pentru activarea  
pesticidului se dizolvă 10 mg acid 2,4-diclorofenoxiacetic, 10 mg N-hidroxisuccinimida și  
30 mg 1-etil-3-(3-dimetilaminopropilcarbodiimida) (CDI) în 1 ml dimetilformamida (DMF).  
Amestecul se agită timp de 2 h pentru activarea grupării carboxi a pesticidului. În final 0,5 ml  
soluție de pesticid activat se adaugă picătură cu picătură la 2 ml soluție de conjugat  
albumină-serică de caprină-biotină în tampon carbonat de sodiu 10 mM pH 9,6 rezultat în  
etapa precedentă și lăsat să reacționeze timp de 3 h la temperatura camerei și 24 h la 4°C iar  
produsul obținut acid 2,4-diclorofenoxi-albumină serică de caprină-biotină se purifică pe  
coloana de Sephadex G25 având ca eluent tamponul fosfat 10 mM pH 7,4. Produsul acid  
2,4-diclorofenoxi-albumina serică de caprină-biotină se depozitează la -20°C în vederea  
utilizării în tehnica imunochimică de dozare a pesticidului 2,4-D din probe alimentare și de  
mediu.

Exemplu 25

Procedeeul de obținere a markerului acid 2,4-diclorofenoxi-albumină serică de caprină-  
biotină constă în 6 etape, E1÷E6. 27

E1) *Activarea biotinei cu N-hidroxisuccinimida și 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil-  
carbodiimida) (CDI)* 29

5 mg de biotină, 5 mg N-hidroxisuccinimida (NHS) și 20 mg 1-etil-3-(3-dimetilamino-  
propilcarbodiimida) (CDI) au fost dizolvate în 1 ml dimetilsulfoxid și lăsate să reacționeze  
timp de 1 h la temperatura camerei în vederea activării grupării carboxi a biotinei. 31

E2) *Cuplarea biotinei activate la albumina serică de caprină* 33

Amestecul activat în etapa E1 se adaugă picătură cu picătură la 3 ml soluție albumină  
serică de caprină (10 mg/ml) în tampon carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6 și lăsat să  
reacționeze 3 h la temperatura camerei și timp de 24 h la 4°C. 35

E3) *Purificarea conjugatului albumina serică de caprină-biotină* 37

Produsul rezultat în etapa E2 conjugat albumina serică de caprină-biotină (ASC-  
biotina) se purifică pe coloana de Sephadex G25 (H = 30 cm și  $\Phi = 1$  cm) având ca eluent  
tamponul carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6. 39

E4) *Activarea pesticidului acid 2,4-diclorofenoxiacetic cu N-hidroxisuccinimida și  
1-etil-3-(3-dimetilaminopropilcarbodiimida) (CDI)* 41

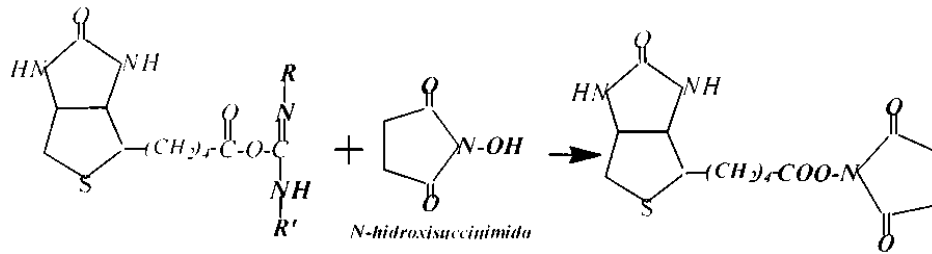
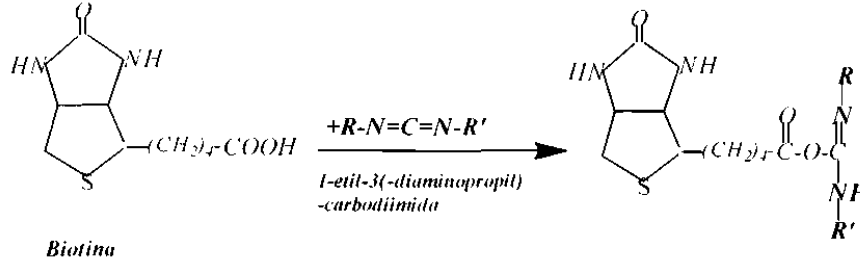
Se dizolvă 10 mg acid 2,4-diclorofenoxiacetic, 10 mg N-hidroxisuccinimida și 30 mg  
1-etil-3-(3-dimetilaminopropilcarbodiimida) (CDI) în 1 ml dimetilformamida (DMF). Amestecul  
se agită timp de 2 h pentru activarea grupării carboxi a pesticidului. 45

# RO 132003 B1

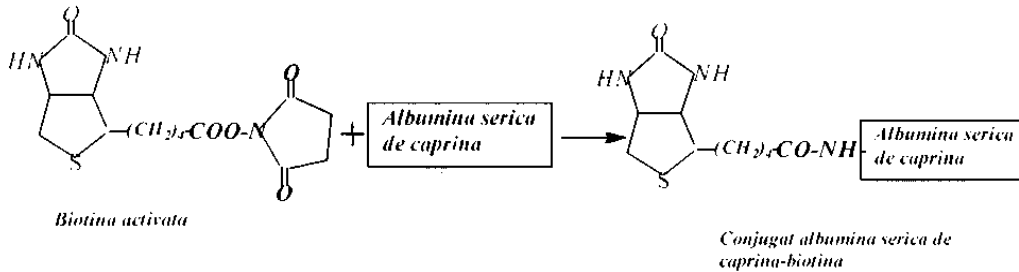
1 E5) *Cuplarea pesticidului activat la conjugatul albumina serică de caprină-biotină*  
 2 0,5 ml soluție de pesticid activat în etapa E4 se adaugă picătură cu picătură la 2 ml soluție  
 3 de conjugat aibumina serică de caprină-biotină în tampon carbonat de sodiu 10 mM pH 9,6  
 rezultat în etapa E3 și lăsat să reacționeze timp de 3 h la temperatura camerei și 24 h la 4°C.

5 E6) *Purificarea produsului acid 2,4-diclorofenoxi-albumina serica de caprina-biotina*  
 6 Produsul obținut în etapa E5 acid 2,4-diclorofenoxi-albumina serică de caprină-biotină  
 7 se purifică pe coloana de Sephadex G25 (H = 30 cm și Φ = 1 cm) având ca eluent tamponul  
 fosfat 10 mM pH 7,4.

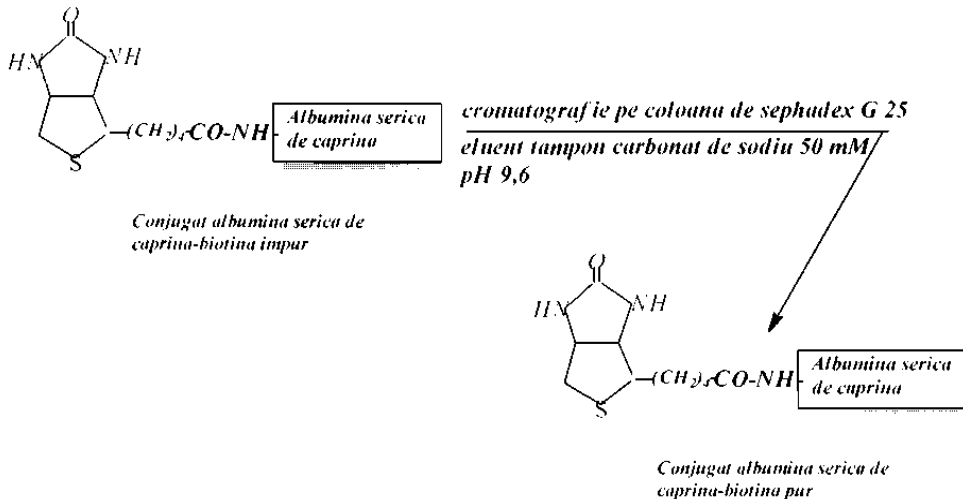
9 **E1) Activarea biotinei cu N-hidroxisuccinimida și 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida**



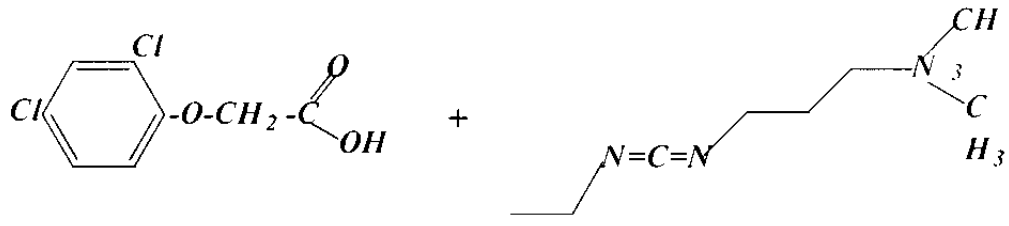
27 **E2) Cuplarea biotinei activate la albumina serica de caprina**



37 **E3) Purificarea conjugatului albumina serica de caprina-biotina**

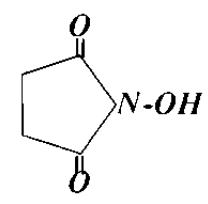
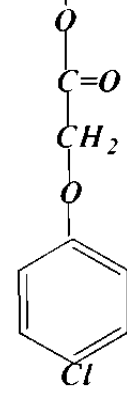
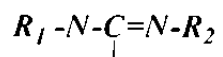


E4) Activarea pesticidului acid 2,4-diclorofenoxiacetic cu N-hidroxisuccinimida si 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (CDI)

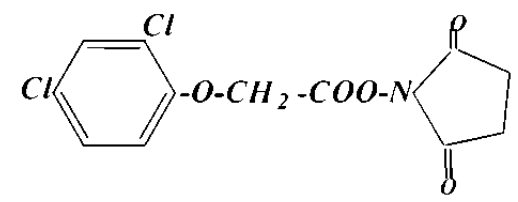


acid 2,4 diclorofenoxiacetic (2,4D)

1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida

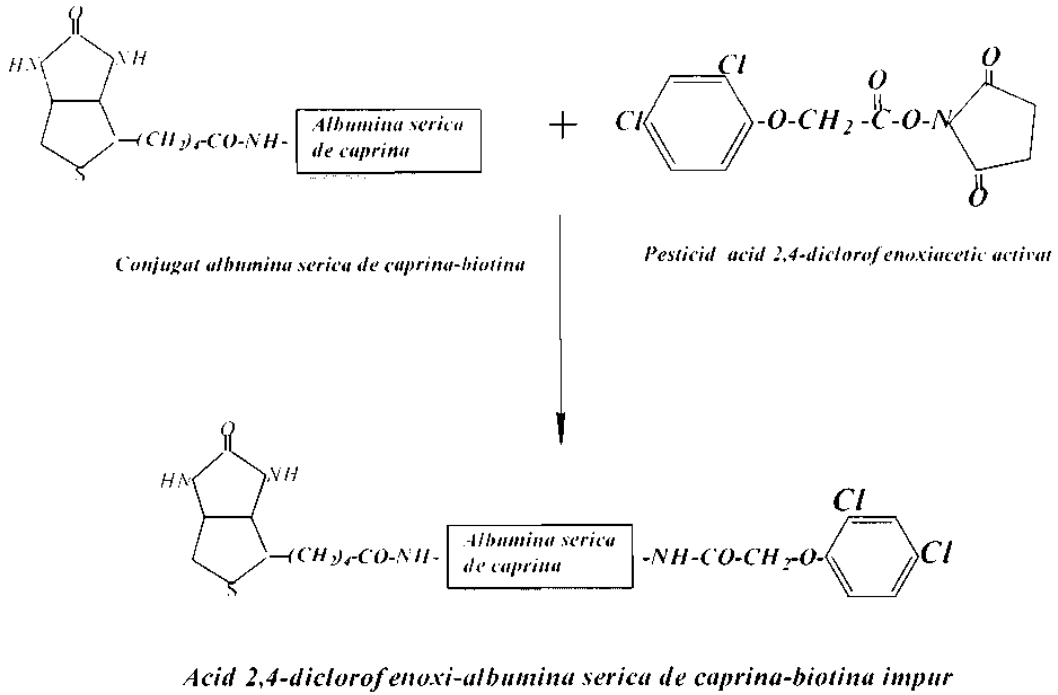


N-hidroxisuccinimida (NHS)

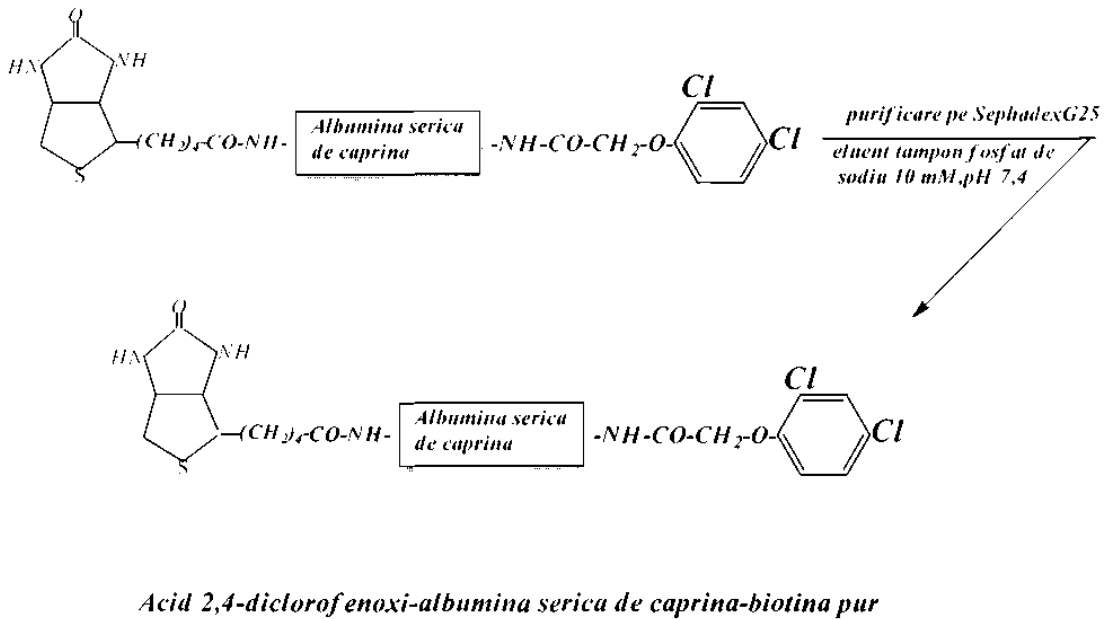


Pesticid acid 2,4-diclorofenoxiacetic activat

E5) Cuplarea pesticidului activat la conjugatul albumina serica de caprina-biotina



E6) Purificarea produsului acid 2,4-diclorofenoxi-albumina serica de caprina-biotina



Procedeul de obținere al markerului 2,4-diclorofenoxi-albumină serică de caprină-biotină, <b>caracterizat prin aceea că</b> se dizolvă 5 mg biotină, 5 mg N-hidroxisuccinimidă și 20 mg 1-etil-3-(3-dimetilaminopropilcarbodiimidă) în 1 ml dimetil sulfoxid și este lăsat să reacționeze timp de 1 h iar amestecul rezultat se adaugă la 3 ml soluție de albumină serică de caprină de concentrație 10 mg/ml sub agitare continuă în tampon carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6 și este lăsat să reacționeze timp de 3 h la temperatura camerei și 24 h la 4°C rezultând albumina serică de caprină-biotină care se purifică pe coloana de sephadex G25 care are ca eluent carbonatul de sodiu 50 mM pH 9,6 iar albumina serică de caprină-biotină purificată a fost pusă să reacționeze cu un amestec pesticid activat obținut din 10 mg acid 2,4-diclorofenoxiacetic, 10 mg N-hidroxisuccinimidă și 30 mg letil-3-(3-dimetilaminopropilcarbodiimidă) în 1 ml dimetilformamidă timp de 2 h și în final reacția de cuplare a pesticidului activat la conjugalul albumina serică de caprină-biotină care se desfășoară timp de 3 h la temperatura camerei și 24 h la 4°C, iar produsul acid 2,4-diclorofenoxi-albumina serică de caprină-biotină se purifică pe coloana de Sephadex G25 având ca eluent tamponul fosfat 10 mM pH 7,4 și se depozitează la -10°C în vederea utilizării în tehnica imunochimică de dozare în faza omogenă a pesticidului acid 2,4-diclorofenoxiacetic din probe alimentare și de mediu.	3 5 7 9 11 13 15 17 19
--	--

