



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2020 00754

(22) Data de depozit: 19/11/2020

(41) Data publicării cererii:  
30/06/2021 BOPI nr. 6/2021

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE  
DEZVOLTARE PENTRU PROTECȚIA  
MEDIULUI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI  
NR. 294, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:  
• ILIE MIHAELA, STR.CETATEA DE BALTĂ,  
NR.11-39, BL.31, SC.2, ET.4, AP.37,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;  
• DEAK GYORGY, STR.FLORILOR, BL.43,  
SC.2, AP.5, BĂLAN, HR, RO;

• GHIȚĂ GINA, SPLAIUL INDEPENDENȚEI,  
NR.292A, ET.2, AP.18, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• MARINESCU FLORICA, STR.BURDUJENI,  
NR.3A, BL.GC5, SC.A, ET.4, AP.18,  
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;  
• TOCIU CARMEN, STR.FLOARE ROȘIE  
NR.7, BL.51, SC.2, AP.65, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• MATEI MONICA SILVIA, ALEEA CÂLNĂU  
10-16, ET.1, AP.14, SECTOR 3,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• HOLBAN ELENA, STR.TOAMNEI, NR.6C,  
SAT DUDU, COMUNA CHIAJNA, IF, RO

(54) **METODĂ DE EXTRAȚIE RAPIDĂ PENTRU DETERMINAREA  
ANTIBIOTICELOR DIN BIOTĂ (PEȘTI) PRIN  
CROMATOGRAFIE DE LICHIDE DE ULTRA- ÎNALTĂ  
PERFORMANȚĂ CUPLATĂ CU SPECTROMETRIE DE MASĂ  
ÎN TANDEM (UHPLC-MS/MS)**

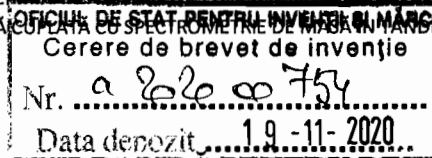
(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de detecție a micropoluantilor farmaceutici din matrice de mediu. Metoda, conform invenției, constă în aceea că, o probă de 50 g biotă de tip țesut de pește, uscat și mărunțit, este supusă extracției într-o celulă de extracție în solvent acetoneitril: metanol în raport 1: 1 v/v, la temperatura de 80°C, presiunea de 1500 psi, timp de 15 min și 1 ciclu static, rezultând un extract care se purifică prin extracție online pe fază solidă, în flux de acetoneitril, urmată de

detecția simultană a reziduurilor de antibiotice prin cromatografie de lichide de ultraperformanțăcuplată cu spectrometrie de masă în tandem, la nivelul de detecție 6,35 ng/g pentru doxiciclină, respectiv, 0,16 ng/g pentru metronidazol, cu o limită de detecție și cuantificare pentru micropoluantii țintă de 0,04 ng/g.

Revendicări: 1





**METODĂ DE EXTRAȚIE RAPIDĂ PENTRU DETERMINAREA ANTIBIOTICELOR DIN BIOTĂ (PEȘTI) PRIN CROMATOGRAFIE DE LICHIDE DE ULTRA-ÎNALTĂ PERFORMANȚĂ CUPLATĂ CU SPECTROMETRIE DE MASĂ ÎN TANDEM (UHPLC-MS/MS)**

14

Invenția se referă la o metodă de extracție rapidă pentru determinarea reziduurilor de antibiotice din probe de biotă (pește). Metoda constă din următoarele etape: (1) proba de biotă (pește) se introduce într-o celulă de extracție și se realizează extracția cu un amestec de solvenți acetonitril și metanol la temperatură de 80°C și presiune de 1500 PSI, utilizând echipamentul ASE (Accelerated Solvent Extraction); (2) extractul obținut se purifică prin extracție online pe fază solidă (Solid Phase Extraction - SPEonline) în flux de acetonitril; (3) determinarea simultană a două antibiotice, respectiv doxicilină și metronidazol, prin cromatografie de lichide de ultra-înaltă performanță cuplată cu spectrometrie de masă în tandem (UHPLC-MS/MS).

Principalele îngrijorări ca urmare a prezenței micropoluantilor farmaceutici emergenți în apele de suprafață sunt potențialul acestora de bioacumulare și bioconcentrare în organismele acvatice. În vederea efectuării acestor cercetări sunt necesare tehnici analitice cât mai sensibile pentru detecția și cuantificarea micropoluantilor farmaceutici, implicit metode rapide pentru extracția acestora din biotă. Peștii sunt indicatori reprezentativi ai poluării mediului acvatic datorită capacității lor de a prelua și concentra în țesuturi micropoluantii conținuți în apă.

Dintre tehnicile de extracție a diferiților compuși organici din probe de biotă utilizate în străinătate menționăm: **(1)** extracția probei de țesut de pește cu acid tricloracetic (TCA 5%) urmată de vortexare (timp de 30 secunde), omogenizare prin agitare și centrifugare urmată de analiza prin cromatografie lichidă rapidă cu ionizare electrospray-spectrometrie de masă tandem (LC-ESI-MS/MS) pentru screeningul a șase clase de antibiotice (aminoglicozide, beta-lactami, macrolide, chinolone, sulfonamide și tetraciline); **(2)** tehnica utilizând ultrasunete dezvoltată de Schultz (vezi M.M. Schultz, E.T. Furlong, D.W.Kolpin, S.L.Werner, H.L. Schoenfuss, L.B. Barber, V.S. Blazer, D.O. Norris, A.M. Vajda, Antidepressant pharmaceuticals in two U.S. effluent-impacted streams: occurrence and fate in water and sediment, and selective uptake in fish

neural tissue. *Environ. Sci. Technol.* **44** (2010) 1918), folosind ca solvent de extracție un amestec de acid acetic/etanol (1:1). Extracția s-a realizat în 3 cicluri (15 min fiecare) și supernatantul colectat după fiecare ciclu a fost centrifugat la 3500 rpm timp de 5 min.; (3) metoda QuEChERS (Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe), dezvoltată de Anastassiades și colaboratori (vezi Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, Schenck FJ (2003) Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/ partitioning and “dispersive solid phase extraction” for the determination of pesticides residues in produce. *J AOAC Int* 86:412–431) ce implică extracția și purificarea la micro-scară a extractului folosind extracție dispersivă în fază solidă (d-SPE) și aplicată pentru determinarea pesticidelor din țesut de pește (vezi M. V. Barbieri, C. Postigo, N. Guillem-Argiles, L. S. Monllor-Alcaraz, J. I. Simionato, E. Stella, D. Barceló, M. López de Alda. *Analysis of 52 pesticides in fresh fish muscle by QuEChERS extraction followed by LC-MS/MS determination. Science of the Total Environment, Vol. 653, 2019, 958-967*); (4) metoda de extracție lichidă la presiune PLE (pressurized liquid extraction) pentru determinarea din țesut de pește a compușilor bifenil policlorurați (PCB-uri), hidrocarburi policiclice aromatice (PAH-uri) și pesticide organo-clorurate (OCP-uri) aplicată de Helaleh (vezi M. I. H. Helaleh, A. Al- Rashdan. *Automated pressurized liquid extraction (PLE) and automated power-prep™ clean-up for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons, organo-chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls in marine samples. Analytical Methods, vol.6, 2013*).

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în elaborarea unei metode de extracție rapidă pentru determinarea reziduurilor de antibiotice din probe de biotă (pești) prin extracție cu solvenți organici (acetonitril și metanol) la temperatură și presiune, urmată de purificarea extractului prin extracție online pe fază solidă (Solid Phase Extraction - SPEonline) în flux de acetonitril și detecția simultană a antibioticelor doxicilină și metronidazol prin cromatografie de lichide de ultra-înaltă performanță cuplată cu spectrometrie de masă în tandem (UHPLC-MS/MS). Comparativ cu alte metode de extracție raportate în literatura de specialitate, metoda prezintă un timp de extracție redus, o selectivitate mare și limite de detecție a antibioticelor doxicilină și

13

metronidazol la nivel de ng/g. Întregul proces de extracție este complet automatizat și efectuat în câteva minute pentru o extracție rapidă cu consum redus de solvent fiind o alternativă foarte bună la metodele tradiționale pentru extracția poluanților din biotă. Din informațiile noastre, această metodă de extracție pentru detecția antibioticelor din biotă (pești) nu se utilizează sau nu se aplică în condițiile prezentate.

12

O celulă de extracție din inox de 100 ml a fost umplută cu o cantitate de țesut de pește, uscat prin congelare și mărunțit în vederea omogenizării și pământ diatomic (agent de uscare). La cele două extremități ale celulei au fost introduse filtre din celuloză. Extracția a fost efectuată în următoarele condiții optime experimentale: solvenți de extracție a antibioticelor acetonitril:metanol (1:1, v/v), temperatura de 80°C, presiunea de 1500 PSI, o cantitate de probă de biotă (pește) de 50 g, un timp static de 15 minute și 1 ciclu static, un volum de spălare de 60% și un timp de purjare cu azot de 250 secunde. Extracția s-a realizat cu echipamentul Dionex ASE 350 (Accelerated Solvent Extraction).

Extractul obținut se utilizează pentru identificarea și cuantificarea antibioticelor prin metoda SPEonline-UHPLC-MS/MS. Metoda cel mai frecvent utilizată pentru detecția micropoluanților farmaceutici din diferite matrici de mediu este extracția pe fază solidă (SPEoffline) urmată de cromatografie de lichide cuplată cu spectrometrie de masă în tandem (HPLC-MS/MS). Comparativ cu această tehnică, deși se obțin rezultate comparabile ca selectivitate și sensibilitate, metoda utilizată pentru detecția de antibiotice prin tehnica SPEonline prezintă avantajul separării compușilor de interes mult mai rapid, cu consum redus de solvenți față de tehnica SPEoffline și extracția lichid-lichid (LLE) folosită în mod tradițional, urmată de detecția cu ajutorul unui spectrometru de masă triplu cuadrupol.

În continuare se prezintă un exemplu pentru aplicarea metodei conform invenției.

Pentru a demonstra aplicabilitatea metodei inovative de extracție, aceasta a fost aplicată pentru determinarea antibioticelor doxicilină și metronidazol, la nivel de ng/g într-o probă de biotă (pește) din Fluviul Dunărea – zona Braț Epurașu. Extracția s-a

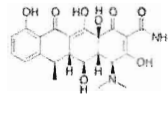
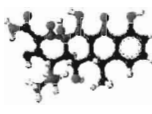

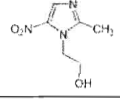


realizat într-o celulă de extracție din inox de 100 ml în care s-a introdus o cantitate de țesut de pește de 50 g, uscat prin congelare și mărunțit în vederea omogenizării și pământ diatomitic (agent de uscare). La cele două extremități ale celulei au fost introduse filtre din celuloză. Extracția a fost efectuată în următoarele condiții optime experimentale: solvenți de extracție a antibioticelor acetonitril:metanol (1:1, v/v), temperatura de 80°C, presiunea de 1500 PSI, o cantitate de probă de biotă (pește) de 50 g, un timp static de 15 minute și 1 ciclu static, un volum de spălare de 60% și un timp de purjare cu azot de 250 secunde. Extracția s-a realizat cu echipamentul Dionex ASE 350 (Accelerated Solvent Extraction).

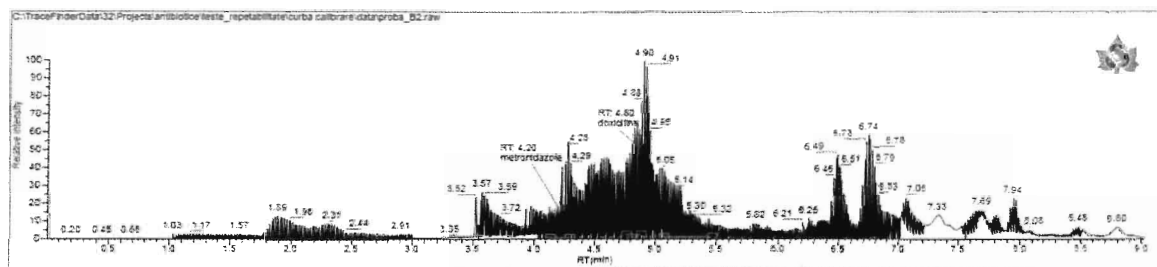
Compușii țintă, respectiv antibioticele doxicilină și metronidazol, au fost identificate și cuantificate într-o singură injecție, cu un timp de rulare cromatografică de numai 14 minute. Detecția și cuantificarea antibioticelor doxicilină și metronidazol din extractul obținut prin metoda descrisă anterior s-a realizat cu echipamentul SPE-online-UHPLC-MS/MS Thermo Fisher Scientific™ EQuan MAX Plus™UltiMate 3000 sistem cuplat cu spectrometru de masă triplu cuadrupol TSQ Quantiva. Sistemul oferă performanțe cantitative excepționale cu un nivel de sensibilitate de atograme ( $10^{-18}$ g). Tehnica utilizată este cea mai sensibilă și selectivă în comparație cu alte tehnici analitice utilizate frecvent, permițând detecția și cuantificarea poluanților emergenți din categoria produselor farmaceutice la nivel de ng/g.

Sistemul a fost echipat cu o coloană de separare SPEonline de tip Thermo Scientific Hypersil GOLD C18. Fazele mobile au fost compuse din apă cu 0.1% soluție de acid formic ca fază mobilă A și acetonitril cu 0.1% soluție de acid formic ca fază mobilă B. Debitul a fost de  $0.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Spectrometru de masă triplu cuadrupol TSQ QUANTIVA (ThermoFisher, SUA), echipat cu o interfață de ionizare prin pulverizare electronică (ESI), selectat în modul ion pozitiv, a fost utilizat pentru detecția celor două antibiotice doxicilină și metronidazol. Condițiile optime de monitorizare selectivă a reacțiilor (SRM) au fost efectuate la următorii parametri: tensiunea de pulverizare ionică, 3500 V; temperatura tubului de transfer de ioni, 350°C; temperatura sursei de ioni, 300°C. Valorile energiei de coliziune și tranzițiile pentru modul SRM, sunt prezentate în tabelul 1:

Tabel 1. Parametrii de funcționare în modul SRM pentru detecția antibioticelor doxicilină și metronidazol

Compus	Timp de retenție (min)	Polaritate	Precursor ion (m/z)	Produși (m/z)	Energie de coliziune (V)	Formulă chimică
Doxicilină	4.8	Positiv	445.2	154 428	27 18	 Formulă moleculară: $C_{22}H_{24}N_2O_8$ Masă moleculară: 444,43 g/mol
						 
Metronidazol	4.2	Positiv	172	82 128	23.9 14	 Formulă moleculară: $C_6H_9N_3O_3$ Masă moleculară: 171,064 g/mol
						 

Figura 1. Screening (SRM) pentru detecția *micropoluantilor farmaceutici* - probă biotă (pește) – zona Braț Epurașu – F. Dunărea

Dezvoltarea metodei pentru detecția antibioticelor doxicilină și metronidazol a fost realizată în conformitate cu criteriile de confirmare cantitativă descrise în Decizia 2002/657/CE de stabilire a normelor de aplicare a Directivei 96/23/CE a Consiliului privind funcționarea metodelor de analiză și interpretarea rezultatelor.

Antibioticele doxicilină și metronidazol au fost detectate în proba de biotă la nivelul de 6.35 ng/g și respectiv 0.16 ng/g. Caracteristicile de performanță ale metodei au fost evaluate în ceea ce privește liniaritatea, precizia și limitele de detecție. Precizia metodei, calculată ca abatere standard relativă (RSD), a fost de 2,8% pentru metronidazol și 3,0% pentru doxicilină. Limita de detecție pentru compuşii țintă a fost de 0.04 ng/g.

## REVENDICĂRI

Metoda de extracție rapidă pentru determinarea reziduurilor de antibiotice din probe de biotă (pește) caracterizată prin aceea că o probă de biotă (pești) de 50 g, se introduce în celula de extracție a echipamentului Dionex ASE 350, apoi se supune etapei de extracție în următoarele condiții experimentale: solvenți organici de extracție a antibioticelor acetonitril:metanol în raport volumetric de 1:1, temperatura de 80°C, presiune de 1500 PSI, timp static de 15 minute și 1 ciclu static, un volum de spălare de 60% și un timp de purjare cu azot de 250 secunde. Extractul obținut se purifică prin extracție online pe fază solidă (Solid Phase Extraction - SPEonline) în flux de acetonitril, urmată de detecția simultană a antibioticelor doxicilină și metronidazol prin cromatografie de lichide de ultra-înaltă performanță cuplată cu spectrometrie de masă în tandem (UHPLC-MS/MS).